



PREMIS A TREBALLS DE RECERCA DE LA UdL
per a l'estudiantat de batxillerat i cicles formatius de grau superior

**Aprofitament nutricional de l'ordi. Elaboració d'un
aliment funcional a partir de farines enriquides en
compostos bioactius**

Miranda Eid Awad

Tutor/a: Xavier Llobera Rames

Centre: Col·legi Maristes
Montserrat (Lleida)

Data: 2019

Aprofitament nutricional de l'ordi

**Elaboració d'un aliment funcional a partir de farines enriquides
en compostos bioactius**



ÍNDEX

0. Introducció	4
1. L’ordi.....	7
1.1 Origen i domesticació	7
1.2 Classificació i tipus	9
1.3 Estructura i composició	11
1.3.1 Introducció.....	11
1.3.2 Glúcids.....	13
1.3.2 Proteïnes	20
1.3.3 Lípids	21
1.3.4 Minerals	22
1.3.5 Fitoquímics	22
1.4 Cultiu i producció	23
1.4.1 Espanya.....	23
1.4.2 Catalunya	25
1.5 Usos	26
2. Part pràctica.....	27
2.1 Mètode del perlat	28
2.1.1 Procés de perlat	29
2.2 Anàlisi de compostos bioactius: Farines	31
2.2.1 Quantificació de β -glucans.....	31
2.2.2 Quantificació d’Arabinxilans	42
2.2.3 Quantificació de fenols.....	50
2.2.4 Activitat antioxidant.....	60
2.3 Elaboració de galetes enriquides en compostos bioactius	73

2.3.1 Tria de fraccions.....	73
2.3.2 Elaboració de galetes.....	74
2.4 Anàlisi de compostos bioactius: Galetes	78
2.4.1 Quantificació β -glucans	80
2.4.2 Quantificació d’Arabinoxilans	83
2.4.3 Quantificació de fenols.....	84
2.4.4 Activitat antioxidant.....	86
3. Conclusions	89
4. Bibliografia.....	94
Annex I. Full de càlcul. Quantificació de β -glucans.	99

0. Introducció

El treball de recerca que es presenta a continuació tracta sobre el primer cereal domesticat per l’home, l’ordi, l’interès del qual ha anat augmentant darrerament, tant per les aplicacions en el camp de la nutrició com en el de la salut.

Nombrosos estudis científics han demostrat els efectes beneficiosos que poden tenir múltiples compostos bioactius d’aquest cereal, entre els quals destaquen els β -glucans, els arabinoxilans, i els compostos fenòlics.

Els β -glucans són uns polisacàrids de glucosa que es troben principalment a l’interior del gra que poden actuar reduint els nivells de colesterol en sang, millorant el sistema immunològic o els efectes cancerígens. Per aquest motiu l’Agència Europea de Seguretat Alimentària (EFSA) reconeix la seva importància i recomana prendre’n una dosi diària de 3 grams. També altres organitzacions com la U.S. Food and Drug Administration (2006) recomana el consum d’ordi per reduir el colesterol i les malalties coronàries.

Pel que fa als arabinoxilans són polisacàrids de pentoses localitzats en les cobertes externes del gra, relacionats amb propietats antioxidants, és a dir, que ajuden a retardar i prevenir l’oxidació d’altres molècules evitant així reaccions en cadena que danyen la pròpia cèl·lula. També se’ls atribueixen efectes positius relacionats amb metabolisme lipídic i del sucre, així com activitat immunoreguladora.

I finalment, els compostos fenòlics que es poden trobar lligats a altres compostos del gra o en forma lliure i que destaquen per la seva activitat antioxidant.

Gràcies a aquest ampli ventall d’avantatges que ens ofereix aquest cereal sorgeixen les diverses vies d’investigacions que busquen treure el màxim benefici i incorporar aquests compostos bioactius en aliments que puguin arribar a formar part de la nostra dieta.

En aquest Treball de Recerca per tant, parteixo amb l’**objectiu** d’estudiar la presència de determinats compostos bioactius i la seva distribució en les diferents capes del gra d’ordi, per tal d’obtenir farines de determinades fraccions amb un alt contingut en un o diversos d’aquests compostos. Posteriorment, aquestes farines podrien constituir la matèria primera a partir de la qual es puguin elaborar aliments funcionals, com per exemple galetes.

Per tal d’aconseguir aquestes farines enriquides, de cada mostra corresponent a una fracció del gra d’ordi s’estudiarà la quantitat de fibra, que inclou β -glucans i arabinxilans, els fenols de tipus lliure i lligat i finalment l’activitat antioxidant.

La varietat d’ordi amb la que s’efectuaran els processos esmentats és una varietat única obtinguda a partir de l’encreuament d’una varietat americana rica en β -glucans i una altra europea amb bon rendiment agronòmic. Aquesta nova varietat està adaptada a les condicions ambientals de cultiu d’Espanya, s’anomena *Annapurna* i és fruit d’investigacions portades a terme en l’Escola Tècnica Superior d’Enginyeria Agrària (ETSEA) de la Universitat de Lleida.

Per tant la **hipòtesi** principal a comprovar és la possibilitat de preparar aliments utilitzant com a matèria primera farines d’ordi (de determinades fraccions) seleccionades per la seva riquesa en fibra (β -glucans o arabinxilans), i/o compostos fenòlics amb activitat antioxidant, el consum dels quals aportaria un benefici per a la salut.

Partim amb un coneixement sobre la distribució d’aquests compostos bioactius en el gra d’ordi. S’han portat a terme treballs semblants amb altres varietats d’ordi en els que s’ha arribat a deduir que els arabinxilans i fenols es presenten en les capes més superficials del gra, a diferència dels β -glucans que abunden en l’interior. En aquest treball analitzarem si succeeix el mateix amb l’*Annapurna*.

En els darrers anys el món de la investigació ha assolit força importància, gràcies a la conscienciació de la població sobre la rellevància de seguir perfeccionant el nostre entorn i treure el màxim de profit als recursos dels que disposem, així com trobar noves aplicacions i/o utilitats a aliments o objectes al nostre abast. Poder ser partícip d’aquesta “revolució de la investigació” és un gran incentiu que em motiva a seguir treballant.

Per realitzar aquest treball hem emprat el mètode del “perlat¹” mitjançant el qual s’aconsegueix farina de les diverses fraccions del gra d’ordi, (0-5)%, (5-10)%, (10-15)%, (15-20)%, (20-25)%, (25-30)% i (30-40)% i resta del gra, (40-100)%. En cada fracció s’ha mesurat la quantitat de β -glucans, d’arabinxilans, de fenols lliures i lligats i la capacitat antioxidant. Les fraccions destacades per presentar un alt contingut en un determinat compost bioactiu, han estat seleccionades per elaborar un aliment funcional.

¹ Perlat: procés de fricció que té l’objectiu d’arrodonir una determinada substància (“perla”).

L’aliment funcional triat són les galetes, gràcies a la senzillesa dels seus ingredients i de la seva elaboració. Posteriorment, s’han tornat a repetir els mateixos anàlisis a les galetes elaborades per observar possibles variacions a causa del procés de preparació i finalment, una valoració final de les galetes elaborades i el seu caràcter funcional.

1. L’ ordi

L’ordi (*Hordeum vulgare*) és una planta herbàcia anual de la família de les gramínies. Es tracta d’un dels primers cultius mundials, segons la FAO la producció mundial d’ordi en 2016 va assolir 118.030.000 tones, dades que el posicionen com el quart cereal més cultivat al món (tant en àrea de cultiu com en quantitat produïda) després de l’arròs, blat i blat de moro.

Els seus principals usos son la fabricació de pinsos per animals i malta per a la producció de cervesa i whisky. No obstant però, en els darrers anys la recerca sobre la seva composició química ha obert un ampli ventall de noves utilitats encara avui dia en investigació, entre les quals destaca l’alimentació humana.



Figura 1.1. Camp d’ordi.

1.1 Origen i domesticació

L’ordi cultivat, *Hordeum vulgare* L., procedeix del seu avantpassat silvestre *Hordeum vulgare* subespècie *spontaneum*. Aquesta espècie silvestre encara es troba en abundància a moltes parts del sud-est d’Àsia, anomenada **Creixent Fèrtil**.

H. vulgare i *H. spontaneum* difereixen principalment en el tipus de raquis². *H. spontaneum* té el raquis de l’espiga fràgil, conseqüentment quan madura es trenca i cau el gra, mentre que *H. vulgare* té el raquis tenaç i el gra roman en l’espiga a la maduresa

² Raquis: eix longitudinal de l’espiga de l’ordi.

facilitant la seva collita. La evolució de *H. spontaneum* a *H. vulgare* s’anomena domesticació. L’ordi cultivat va ser domesticat al **Creixent Fèrtil** a l’Orient Pròxim, que s’estén a l’actual Israel, al nord de Síria, al sud de Turquia, a l’est l’Iraq i l’Iran occidental (Harlan, 1978) fa almenys 10.000 anys. Tot i que el Creixent Fèrtil és el centre d’origen de l’ordi cultivat més citat en la bibliografia, diferents estudis han proposat l’existència d’altres centres de domesticació com a l’**Etiòpia, Tibet** o **Nepal**.

Tant en les terres etiòps altes com en les muntanyes del Tibet o Nepal hi ha una abundància en l’evidència de la cultura d’ordi primerenca. Un notable agrònom rus, N.I. Vavilov (1926) va constatar la gran diversitat de tipus morfològics d’ordi cultivat que hi ha en aquestes regions.

D’altra banda, el suggeriment de la possible domesticació de l’ordi al **Tibet** ha rebut suport en el descobriment d’*H. spontaneum* a l’altiplà Qinghai-Xizang del Tibet (Xu 1982). Aquesta troballa va reviu la controvèrsia de l’origen de l’ordi cultivat a Orient.

A més a més, la troballa de *H. spontaneum* al sud del Marroc per Molina-Cano el 1982, va provocar un debat científic sobre la possibilitat que el Marroc pogués ser un altre nou centre de domesticació. Igual que amb les plantes d’ordi tibetà, les troballes al Marroc es van diferenciar en moltes de les característiques morfològiques d’aquelles trobades a Afganistan, Iraq, Israel i Líbia (Molina-Cano et al., 2002).

Així, a la llum de l’evidència, es pot suposar en aquest moment que l’*H. spontaneum* va estar present en els temps antics en una àmplia regió, que comença a l’est i el sud d’Àsia i s’estén cap a la Mediterrània occidental, que abasta el nord d’Àfrica.

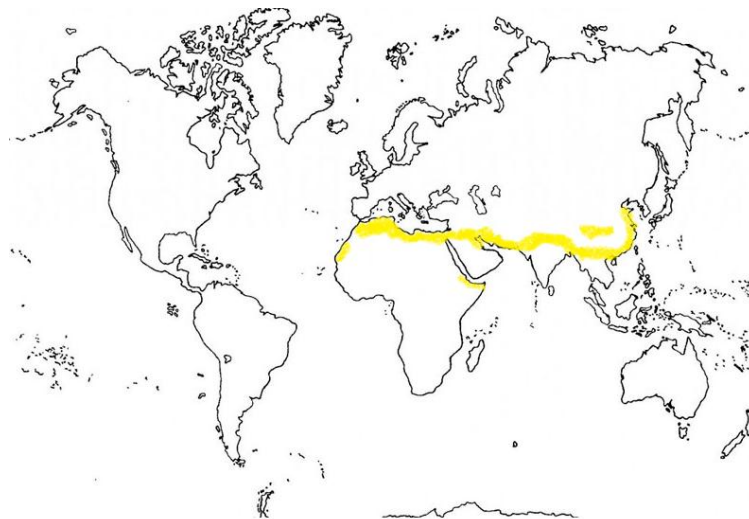


Figura 1.2 Possible distribució geogràfica de les àrees originàries del cultiu d’ordi.

La presència d’ordi silvestre en aquestes zones indica que estava disponible per al seu ús i la domesticació per part de la població humana prehistòrica de fa més de 10.000 anys.

1.2 Classificació i tipus

El gènere *Hordeum* conté espècies diploides ($2n=2x=14$), tetraploides ($2n=4x=28$) i hexaploides ($2n=6x=42$), l’espècie *H. vulgare* en concret és diploide.

La taxonomia de l’ordi o de l’ *H. vulgare* és la següent:

Regne	Plantae
Divisió	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordre	Poales
Família	Poaceae (gramínies)
Gènere	Hordeum
Espècie	<i>H. vulgare</i>

Taula 1.1 Taxonomia de *H. vulgare*.

Dins de l’ordi podem trobar diferents tipus segons la morfologia de l’espiga o el gra:

- **Ordi de dues rengles** (*Hordeum vulgare, distichon* L.) : és aquell que, després de madurar l’espiga, únicament queda l’espigueta central. Aquest tipus són les més primitives ja que s’assimilen a les varietats silvestres que també tenen el mateix nombre de rengles.
- **Ordi de sis rengles** (*Hordeum vulgare, hexastichon* L.): és aquell en el que es mantenen les tres espiguetes. La seva principal utilitat és el farratge del animals.



Figura 1.3 Comparació entre l’espiga d’ordi de dues rengles i la de sis rengles.

Segons si les llavors estan protegides o no, podem classificar les varietats de l’ordi en:

- **Ordi amb llavor vestida:** són aquells en els quals la llavor està protegida per la lemma³ i la pàlea⁴. Aquesta varietat de llavor s’utilitza principalment pel farratge dels animals i en la fabricació de cervesa.
- **Ordi amb llavor nua:** són aquelles que no tenen ni lemma ni pàlea. Aquestes són les varietats que gràcies a la seva evolució poden ser utilitzades pel consum humà.



Figura 1.4 Comparació entre llavor vestida (esquerra) i llavor nua (dreta) de l’ordi.

³ Lemma: part superior de l’element que recobreix la llavor.

⁴ Pàlea: part inferior de l’element que recobreix la llavor.

D’altra banda, segons la composició del gra d’ordi, aquest pot ser classificat en :

- **Normal** : amb nivells estàndard de nutrients.
- **Waxy o amb alt contingut en amilopectina**: les varietats waxy presenten més quantitat d’amilopectina i menys d’amilosa en l’estructura del midó que una varietat normal.
- **Amb alt contingut en lisina**: la lisina és un aminoàcid essencial que ha de ser incorporat en una dieta equilibrada i saludable.
- **Amb alt contingut en β -glucans**: compost bioactiu amb beneficis sobre la salut.
- **Amb alt contingut en antocians**: es tracta d’un compost de tipus fenòlic que presenta activitat antioxidant i proporciona color a la llavor.

1.3 Estructura i composició

1.3.1 Introducció

El gra de l’ordi està compost per un 3,5% d’embrió, un 18% de pericarpi i un 78,5% d’endosperma, amb variabilitat segons la varietat o climatologia.

Pel que fa a la seva composició, conté un 55-60% de midó, un 10-17% de proteïnes, un 10-20% de fibra que inclou els β -glucans i els arabinosilans, un 2-3% de lípids i un 1,5-2,5% de minerals, vitamines i altres compostos anomenats fitoquímics⁵ com els compostos fenòlics i els antocians (Newman and Newman, 2008).

⁵ Els fitoquímics: són substàncies, biològicament actives, que es troben en els aliments d’origen vegetal. Tenen efectes positius en la salut, tot i que no són nutrients essencials per a la vida.

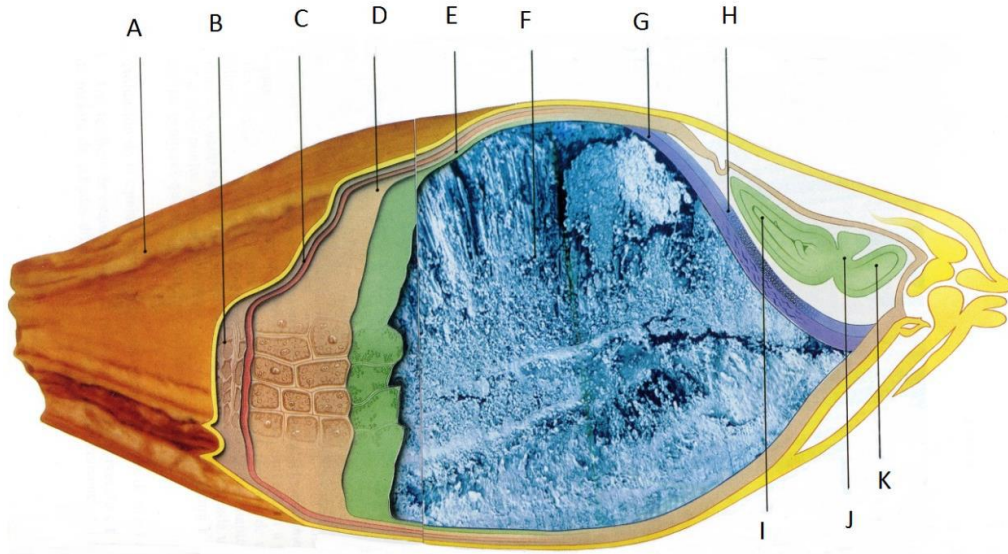


Figura 1.5 Estructura del gra d'ordi. A: Glumes, B: Pericarp, C: Testa, D: Capa d'aleurona, E: Subaleurona, F: Endosperma, G: Capa de cèl·lules buides, H: Escutel amb epitell absorbent, I: Plúmula amb caleòptil, J: Eix caulinar, K: Radícula.

L'herència de certes característiques és fonamental pel cultiu d'ordi per al consum o per a qualsevol altre ús final desitjat.

Hi ha diverses característiques sota el control genètic que es poden introduir selectivament a una varietat de l'ordi per influir o dictar la seva composició nutritiva.

A més a més, es pot utilitzar la selecció genètica per incorporar atributs de valor afegit com ara facilitat de recol·lecció o processament, aspecte del producte, sabor i compostos bioactius.

Tot i que no és possible controlar completament el nivell i ocurrència de tots els nutrients en l'ordi, es poden inserir o expressar certs gens en el genoma, que produeixin des de menors a majors influències sobre la composició (Newman and Newman, 2008).

Els nutrients es dispersen de manera **desigual** en les diferents parts del gra d'ordi, alguns estan més concentrats en una àrea, mentre que altres es concentren en altres parts.

La ubicació i la concentració dels nutrients en el gra d'ordi tenen implicacions importants en la capacitat nutritiva, en els mètodes de processament i en la preparació d'aliments.

Això ha provocat que en els darrers anys s’estudiï la possibilitat de perlar el gra d’ordi per arribar a concentrar els seus nutrients i augmentar el valor nutricional i d’aquesta manera elaborar aliments funcionals pel consum humà.

1.3.2 Glúcids

Els glúcids, carbohidrats o sucres són biomolècules formades bàsicament per Carboni (C), Hidrogen (H) i Oxigen (O), en una proporció similar a $C_nH_{2n}O_n$, és a dir, $(CH_2O)_n$.

Tots els glúcids tenen en comú la possessió d’un grup carbonil, és a dir, un carboni unit a un oxigen mitjançant un doble enllaç. Aquest grup carbonil pot ser de dos tipus: grup aldehyd (-CHO), o un grup cetona (-CO-), segons la posició de l’enllaç en la cadena del glúcid. Així doncs, podríem definir els glúcids són cadenes polihidroxi aldèhiques o polihidroxicetòniques.

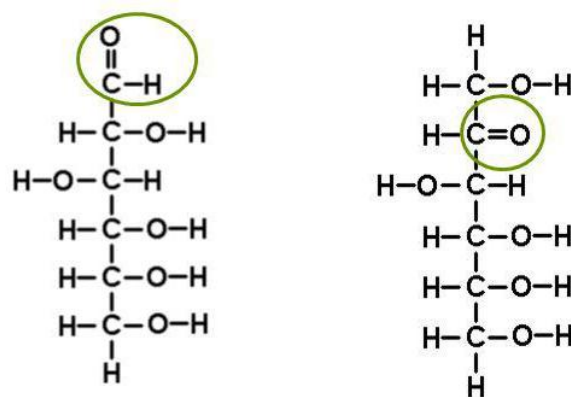


Figura 1.6 Estructura química dels glúcids: Polihidroxi aldehyd (esquerra) amb el grup aldehyd en el carboni 1 i Polihidroxicetona (dreta) amb el grup cetona en el carboni 2.

Els compostos de gran pes molecular com el midó i la cel·lulosa es presenten com a carbohidrats complexos, a diferència dels sucres simples com la glucosa, la fructosa, i sacarosa.

Els carbohidrats complexos, que constitueixen el gruix del gra, generalment es denominen polisacàrids. En l'ordi representen aproximadament el 80% del total de la matèria seca destacant el midó i, en menor proporció, la cel·lulosa, els β -glucans i els

arabinoxilans. El conjunt d’aquests últims polisacàrids juntament amb altres minoritaris s’anomena fibra.

1.3.2.1 Midó

El midó és el component majoritari dels carbohidrats, considerat dins del grup dels polisacàrids solubles, és la font principal d’energia de l’ordi que permet al cereal nodrir-se i créixer després de la germinació. Aquest es troba principalment en l’endosperma del gra i en menors quantitats en l’aleurona i subaleurona.

És un homopolisacàrid format per la unió de moltes glucoses, unides entre elles mitjançant enllaços *O*-glicosídics de tipus α , amb la pèrdua conseqüent d’una molècula d’aigua per cadascun dels enllaços.

El midó de l’ordi està compost per dos tipus d’estructures, **amilopectina i amilosa**. L’amilopectina és un polisacàrid de cadena ramificada en què les unitats α - (1,4) -D-glucosa estan ramificades a través dels enllaços α - (1,6)-D-glucosa, i l’amilosa és principalment una cadena recta d’unitats α -(1,4)-D-glucosa (Briggs 1978). Les molècules d’amilosa d’ordi són més petites que les molècules d’amilopectina, que es presenten en una estructura aleatòria en forma d’hèlix.

En la major part de l’ordi, l’amilopectina és el principal tipus, que representa el 72 a 78% del total, mentre que l’amilosa és del 22 a 28% restant. Per tant la proporció estàndard entre amilopectina i amilosa és de 3: 1.

El terme ordi waxy s’aplica als conreus que contenen alts nivells d’amilopectina, i s’aplica ordi no-waxy a aquells que contenen midó amb la relació normal de 3: 1 d’amilopectina i amilosa.

1.3.2.2 Fibra

La fibra es descriu com polisacàrids no amilacis (NSP en anglès) que tenen una funció estructural en les plantes. En contrast amb el midó i els sucres simples, els NSPs no són digerits pel sistema digestiu humà, per tant, proporcionen poca o cap energia, però són valuosos components de la dieta per altres raons. En l’ordi podem trobar diferents tipus de fibra, com la cel·lulosa, els β -glucans i els arabinoxilans. El conjunt constitueix la fibra dietètica total (TDF).

La cel·lulosa és el principal polisacàrid de les cobertes encara que també es troba en petites quantitats a l’aleurona i l’endosperma. Consisteix en un polímer de cadena llarga amb residus de glucosa units per enllaços β (1-4) i correspon a la fibra insoluble de l’ordi.

Els arabinoxilans i els β -glucans són components integrals de l’estructura de la paret cel·lular tant de l’aleurona com de la capa endospermica, però varien inversament en les seves proporcions en les dues àrees.

Arabinoxilans i β -glucans conformen el 67 i el 26% de les parets cel·lulars de l’aleurona i el 20 i 70% de les parets cel·lulars de l’endosperma, respectivament (Duffus i Cochrane 1993). A més a més es troben petites quantitats de glucomannan i (1,3)- β -glucans a les parets cel·lulars de l’aleurona i l’endosperma.

B-glucans

De tots els components de la TDF (fibra dietètica total) en ordi, els β -glucans són probablement els més importants en termes de dieta humana i beneficis per a la salut. Els β -glucans consisteixen en cadenes lineals d’alt pes molecular de residus de β -glucosil polimeritzades a través de dos enllaços β -(1,3) i β -(1,4).

Els β -glucans d’ordi són membres d’una família de polisacàrids que és heterogènia pel que fa a la mida molecular, la solubilitat i l’estructura molecular (MacGregor and Fincher 1993).

Encara que no és possible mostrar una estructura única per β -glucà, s’ha demostrat que els blocs de dos o tres residus de (1,4)- β -glucosil enllaçats contigus estan separats per enllaços únics β -(1,3) al llarg de la cadena del polisacàrid (Parrish et al. 1960; Woodward et al., 1983a). Les unitats β -glucosil es denominen cel·lotriosils (trisacàrids) i cel·lotetraosils (tetrasacàrids).

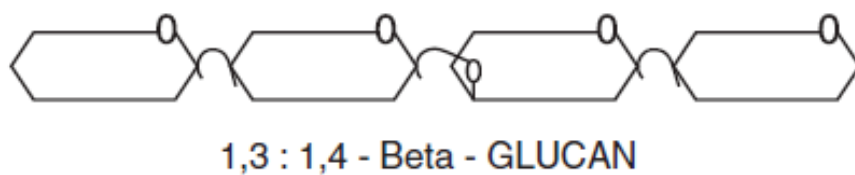


Figura 1.8 Estructura de la molècula de β -glucà.

L’ordi no és l’únic cereal que conté β -glucans . També trobem en la civada o en el blat, no obstant, però l’ordi és el cereal que conté major quantitat amb valors que oscil·len entre 3-9% o inclús superiors.

Els β -glucans dels diferents cereals presenten la mateixa estructura molecular general, però poden variar en les proporcions dels enllaços β -(1-4) / β -(1-3). També poden diferir en la relació de trisacàrids amb tetrasacàrids i en la seva mida molecular (Lazaridou, Biliaderis, & Izydorczyk, 2007).

La solubilitat dels β -glucans d’ordi va ser reconeguda i utilitzada per la indústria cervesera en la identificació de conreus desitjables per al malteig. Els β -glucans d’ordi es consideren components indesitjables en els processos de malteig i cervesa per tres raons: (1) els alts nivells de β -glucans a la malta estan associats amb valors més baixos d’extracte de malta, (2) els β -glucans produeixen extractes viscosos, causant dificultat en la filtració; i (3) els β -glucans no degradats poden crear precipitacions en les begudes (Woodward i Fincher 1983; Bamforth 1985).

La viscositat dels extractes de β -glucà es pot utilitzar en condicions de laboratori per indicar el nivell de β -glucans en l’ordi. Així doncs, aquesta característica es va utilitzar en programes de cultiu d’ordi primerencs de malt per estimar el nivell de β -glucans en l’ordi (Greenberg i Whitmore 1974; Bendelow 1975; Morgan 1977).

Així com la viscositat dels β -glucans d’ordi solubles tenen conseqüències negatives per a les indústries de maltatge i cervesa, en alguns casos, però la producció d’aliments es considera un avantatge en aplicacions dietètiques i de salut (Bhatty, 1992).

El nivell de β -glucà en l’ordi està sota control genètic, encara que la concentració sovint es veu modificada per l’entorn, especialment les condicions seques i calentes durant la maduració del gra. Aquestes condicions gairebé sempre produeixen nivells elevats de β -glucans (Bendelow 1975; Anderson et al., 1978).

S'ha assenyalat que els factors genètics són en gran mesura responsables dels nivells de β -glucans en ordi, però els nivells també estan influïts per les condicions ambientals de creixement.

MacGregor i Fincher (1993) van informar que els continguts de β -glucans del gra d'ordi van del 2,0 al 11,0%, però solen caure entre el 4,0 i el 7,0%. Canviar la relació d'amilosa a amilopectina en el midó d'ordi, ja sigui amb el gen *wax* (de la varietat Waxy) o amb el gen *amo1* (varietat rica en amilosa), té un efecte significatiu en l'augment del contingut de β -glucà.

En les parets cel·lulars de l'endosperma d'ordi, els β -glucans representen el 75% del total de polisacàrids de la paret cel·lular, el percentatge restant correspon als arabinoxilans, cel·lulosa, glucomannans i proteïnes.

Efectes beneficiosos per a la salut dels β -glucans

Els beneficis per a la salut dels β -glucans han fet que gran part de l'enfocament recent de l'ordi s'hagi centrat en l'estudi d'aquest compost bioactiu (Izydorczyk & Biliaderis, 2000).

Hi ha proves que demostren que el consum de β -glucans d'ordi pot conduir a la reducció del colesterol plasmàtic, millorar el metabolisme dels lípids i reduir l'índex glucèmic dels aliments mitjançant la producció d'una viscositat que redueix l'absorció de sucres i colesterol (Behall, Scholfield, & Hallfrisch, 2004, 2005, 2006; Delaney et al., 2003; Keenan et al., 2007; Li, Kaneko, Qin, Wang, & Wang, 2003).

La investigació sobre els β -glucans en civada i ordi i els seus beneficis associats per a la salut ha portat a la FDA a indicar que el consum regular de β -glucà pot reduir el risc de patir malalties del cor (FDA, 1997 i 2005). Tanmateix, per a un producte alimentari que faci aquesta al·legació, ha de contenir almenys 0,75 g de β -glucans /per porció.

La FDA va dictaminar més recentment que 3 g de β -glucans d'ordi /per dia és una ingesta dietètica suficient per aconseguir una disminució del colesterol (LDL), que és una de les substàncies més comunes per a la formació de plaques en les d'artèries que causen arteriosclerosi (FDA, 2006). L'Autoritat Europea de Seguretat Alimentària (EFSA)⁶ va publicar posteriorment en 2011 que els β -glucans de civada i ordi milloren la

⁶ Aquesta informació ha estat extreta de la web : <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2207.htm>.

concentració del colesterol en sang, augmenten la sacietat reduint la ingesta d'energia i la resposta glucèmica postprandial⁷, millorant la funció digestiva.

A més a més recentment s’ha posat molta atenció a l’ús prebiòtic dels β -glucans. Darrerament s'ha apreciat que els β -glucans promouen de forma selectiva el creixement de microorganismes intestinals beneficiosos com els lactobacils i bifidobacteris segons tots dos estudis tant in vitro (Hughes, Shewry, Gibson, McCleary, & Rastall, 2008; Jaskari et al., 1998; Kontula, von Wright, & Mattila-Sandholm, 1998) com en l'experimentació amb animals (Dongowski, & Gebharst, 2005; Snart et al., 2006).

Arabinoxilans

Els arabinoxilans són un dels components principals de la fibra funcional de l’ordi. Es tracta de polímers de xilosa units per enllaços β -(1-4) i ramificacions d’arabinosa β -(1-3), o β -(1-2). A més a més l’arabinosa està esterificada⁸ per un àcid ferúlic, compost fenòlic que li confereix activitat antioxidant.

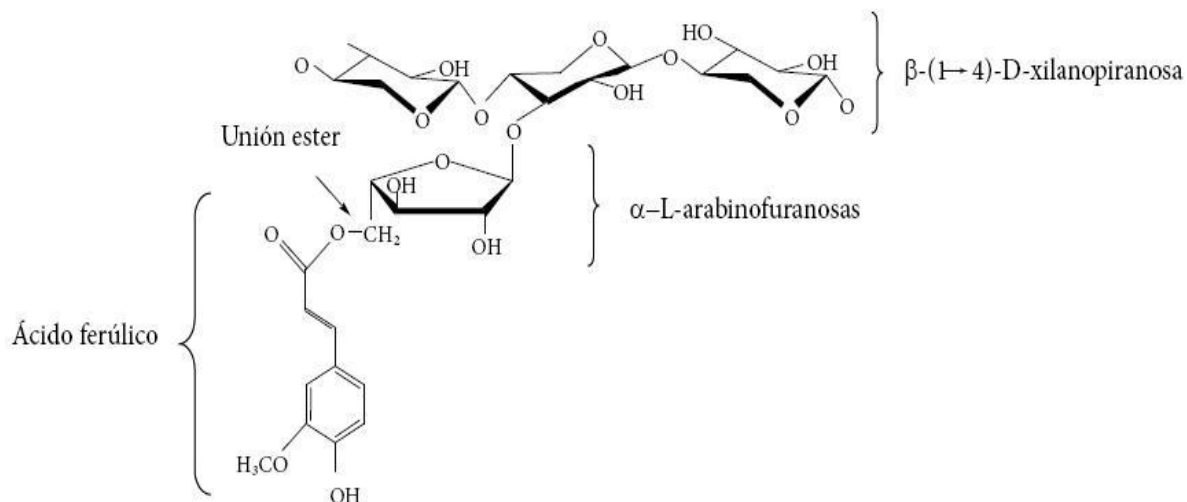


Figura 1.7 Estructura química d’una fracció d’arabinoxilans ferulats identificats en cereals.

⁷ S'anomena glucosa postprandial a la detecció dels nivells de sucre en sang després del menjar.

⁸ Esterificada: que estableix un enllaç de tipus èster amb un altre compost.

La figura de la part anterior [1.7](#) mostra una estructura bàsica, sent aquesta molt més complexa a la realitat, ja que l’àcid ferúlic pot estar enllaçat a altres molècules, com per exemple a lignines (un altre polisacàrid estructural).

Els arabinoxilans es troben principalment a les parets cel·lulars de les cèl·lules de l’aleurona (86%) i l’endosperma (20-25%) , tot i que també es presenten en la closca (Aspinall and Ross 1963). El contingut total al gra d’ordi pot variar entre el 1-12%.

D’altra banda cal destacar que només una petita quantitat dels arabinoxilans (1-5%) és soluble en aigua, i això es deu principalment a la forta unió amb altres components de la paret cel·lular que constitueix una estructura molt complexa insoluble en aigua. També influeix la proporció entre arabinosa i xilosa, com més arabinosa més soluble i viceversa.

Efectes beneficiosos per a la salut dels Arabinoxilans

Els arabinoxilans han rebut atenció en els últims anys a causa de les seves activitats biològiques i del seu potencial immunoregulator. Algunes de les propietats que se li atribueixen són :

Els resultats d’uns estudis d’intervenció humana han demostrat que el consum d’una dieta rica en arabinoxilans (**AXs abreviat**) redueix els nivells de glucosa postprandial en individus sans i pacients diabètics. En subjectes normoglucèmics, (Lu et al. 2000) va reportar una millora significativa en les respostes postoperatòries de glucosa i insulina després del consum d’àpats d’esmorzar rics en AXs extrets del subproducte del processament de farina de blat.

A més a més l’efecte dels AXs sobre els lípids sanguinis i el metabolisme del colesterol s’ha informat en diversos estudis. La suplementació d’AXs ha demostrat un efecte reductor de triglicèrids tant en humans com en animals experimentals.

Els efectes dels AXs sobre la resposta immune innata i adquirida també han estat ben documentats. El potencial immunomodulador dels AXs està controlat per diversos factors, incloent la font, el pes molecular i el grau de substitució d’arabinosa i xilosa. Molts informes suggereixen que tant AXs de baix pes com d’alt pes molecular tenen potencials per millorar la resposta immune.

D’altra banda, com he comentat amb anterioritat els arabinxilans estan ferulats i aquest àcid fenòlic és el responsable de l’activitat antioxidant.

Activitat antioxidant

Els antioxidants són molècules que a baixes concentracions, respecte la substància oxidativa, retarden o prevenen la seva oxidació.

D’altra banda l’activitat antioxidant és la capacitat d’una substància per inhibir la degradació oxidativa (per exemple, la peroxidació lipídica), de tal manera que un antioxidant actua, principalment, gràcies a la seva capacitat per reaccionar amb radicals lliures i, per tant, rep el nom d’antioxidant separador de cadena.

Hi ha una considerable quantitat d’estudis científics a nivell químic, de cultius cel·lulars i en animals que indiquen que els antioxidants poden alentir o possiblement prevenir el desenvolupament d’algunes malalties, com el càncer o les malalties cardiovasculars, i altres degeneratives, com l’Alzheimer o el propi envelliment. Recentment s’estan portant a terme assajos clínics per comprovar l’efectivitat dels antioxidants sobre la població humana, tot i que encara no hi ha resultats evidents.

Per tant, la incorporació d’aliments amb alt contingut en antioxidants podria ajudar en gran mesura a reduir aquest processos oxidatius.

1.3.2 Proteïnes

Les proteïnes són compostos nitrogenats de gran pes molecular, els components bàsics dels quals són els aminoàcids, enllaçats mitjançant enllaços peptídics. Les proteïnes es presenten en moltes formes en el gra d’ordi, sent responsables de les funcions estructurals (paret cel·lular), l’activitat metabòlica, i el subministrament de nitrogen per a l’embrió en desenvolupament en la germinació (proteïnes de reserva). Les proteïnes estructurals i enzimàtiques es troben a l’endosperma i l’aleurona i contenen entre 15-30% del nitrogen total del gra. Les proteïnes de reserva en l’ordi es diuen hordenines, es troben a l’endosperma i contenen entre 35-50% del nitrogen total.

Igual que amb altres cereals, el contingut de proteïna de l’ordi és, en mitjana, relativament baix (10-17%) en comparació amb el de la carn, els ous o productes lactis.

Els nivells de proteïnes i d'aminoàcids en l'ordi estan influïts fortament per la genètica i les condicions de creixement mediambiental, tot i que aquest últim té el major efecte. El nitrogen del sòl disponible és un factor mediambiental important que influeix en els nivells de proteïnes i els nivells d'aminoàcids.

Els aminoàcids essencials són aquells que no pot sintetitzar el sistema metabòlic d'un animal. Depenent de les espècies d'animals, entre 8 i 20 aminoàcids es classifiquen com a essencials. Els aminoàcids no essencials no són necessaris en la dieta, ja que poden ser sintetitzats pel sistema metabòlic de l'animal.

S'ha identificat un total de 18 L-aminoàcids en proteïnes d'ordi, alguns dels quals essencials com per exemple la lisina la metionina, o el triptòfan (Aman and Newman,1986).

1.3.3 Lípids

Els lípids es troben al llarg del gra d'ordi i es classifiquen en dues fraccions bàsiques: lípids no-amilacis i lípids amilacis. Els lípids no-amilacis inclouen tots els lípids que no siguin els de dins dels grànuls de midó.

Els lípids també es classifiquen com polars o no polars, una característica que afecta la solubilitat i depèn de l'estructura molecular. Addicionalment, el terme lípid “lliure” s'ha utilitzat per descriure aquells lípids que es poden extreure amb dissolvents no polars i lípids “ligats” , els que s'extreuen amb dissolvents polars.

El lípid es concentren a l'embrió i, tot i que l'embrió representa només aproximadament el 3% del pes de gra, proporciona al voltant del 18% del lípids totals en l'ordi. L'endosperma conté al voltant del 3% de lípids, però en virtut de la seva grandària, proporciona al voltant del 77% del lípids totals, la major part dels lípids de l'endosperma es troben a la capa d'aleurona. El 5% restant dels lípids del gra total es troba en la closca (Price i Parsons 1975, 1979; Briggs 1978).

Alguns lípids de l'ordi tenen importància com a compostos bioactius. Entre ells destaquen els tocols (Vitamina E) que es troben de forma majoritària a l'embrió del gra, així com els fitosterols (lliures o esterificats amb àcids grassos) situats a les capes més externes del gra.

1.3.4 Minerals

La matèria mineral bruta de l'ordi és la "cendra" restant després de cremar una mostra fins que estigui lliure de carboni. Així, sovint els minerals es denominen nutrients "inorgànics". El contingut de cendres d'ordi típic oscil·la entre el 2.0 i el 3.0%, amb els tipus sense closca a la part inferior i els tipus amb closca a la part superior del rang.

Almenys 14 elements minerals que es consideren nutricionalment importants es presenten en quantitats variables en el gra l'ordi integral.

Els minerals es divideixen en dos grups, macro i micro elements, sobre la base de la seva concentració en aliments.

Els elements macro que es troben en l'ordi són el calci, fòsfor, potassi, magnesi, sodi, clor i sofre, i els micro elements són el cobalt, coure, ferro, iode, manganès, seleni i zinc. S'ha identificat altres elements, com el crom, el níquel i l'alumini en l'ordi en quantitats molt reduïdes, però la seva importància nutricional és qüestionable o desconeguda (Newman and Newman , 2008).

Els minerals es distribueixen al llarg de la llavor, però les concentracions més grans es troben en l'embrió, el pericarp i l'aleurona (Liu et al., 1974; Weaver et al., 1981; Marconi et al., 2000).

1.3.5 Fitoquímics

Els fitoquímics són compostos que es produeixen en les plantes, a part dels nutrients bàsics reconeguts, que s'ha demostrat que tenen accions protectores contra certs tipus de càncer, malalties cardiovasculars i malalties degeneratives com l'artritis, sovint a causa de la seva activitat antioxidant.

Aquesta activitat antioxidant ajuda a reduir els processos oxidatius, nocius per a les cèl·lules, que molt sovint van molt lligats al procés d'envelliment.

Aquests compostos es denominen a vegades fitonutrients, i quan s'extreuen i es purifiquen, sovint es denominen nutraceutics⁹.

⁹ Nutraceutic: un aliment o part d'un aliment que proporciona beneficis mèdics o per a la salut, incloent la prevenció i / o el tractament de malalties.

Les llavors en general contenen diferents tipus de fitoquímics, i en l'ordi els compostos més investigats són **els compostos fenòlics**, la vitamina E i els antocians (Groupy et al., 1999). Gran part de l'activitat antioxidant en cereals, inclòs l'ordi, prové de compostos fenòlics insolubles com l'àcid ferúlic, que estan esterificats a polisacàrids en la paret cel·lular (arabinoxilans) i a lignines (Bunzel et al., 2004). Per tant, distingim entre dos varietats de fenols, els lliures, i els lligats o esterificats/enllaçats a altres compostos.

En l’ordi, les concentracions més grans de compostos fenòlics es localitzen a les capes externes del gra, principalment a l’aleurona (Lampi et al., 2004).

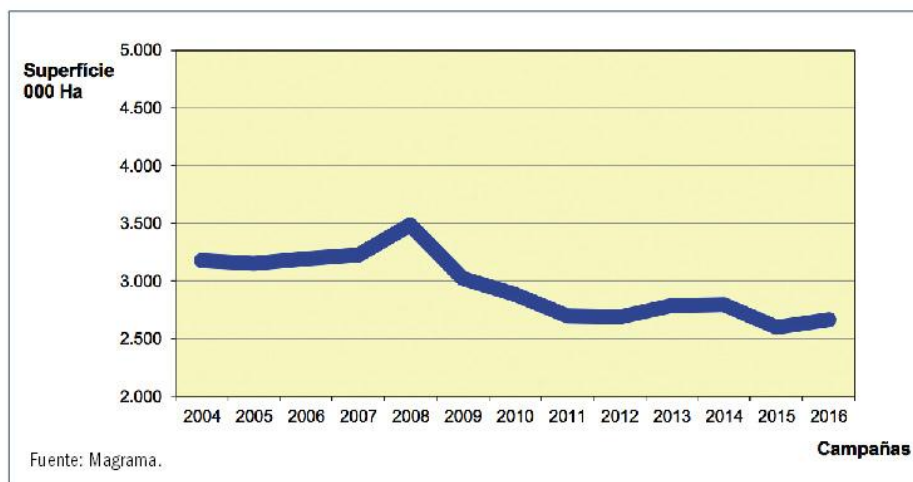
1.4 Cultiu i producció

L'ordi és un dels set grans cereals de cultiu internacional, que va quedar quart en la classificació de la producció mundial darrere del blat de moro, el blat i l'arròs (FAO 2006). La producció d'ordi entre els grans cereals del món no ha canviat gaire en els últims 15 anys. Segons la FAO la producció mundial d'ordi en 2016 va assolir 118.030.000 tones. Els 20 majors productors abasten el 82% del total mundial, entre els quals els tres majors productors són: Rússia, França i Alemanya, mentre que Espanya ocupa la setena posició. La raó de la importància de l’ordi es deu a la seva àmplia adaptació ecològica i al seu diversitat d'aplicacions.

1.4.1 Espanya

Espanya és el país de la UE amb més superfície de conreu dedicada a l'ordi, encara que la producció total estigui al nivell d'Alemanya o França.

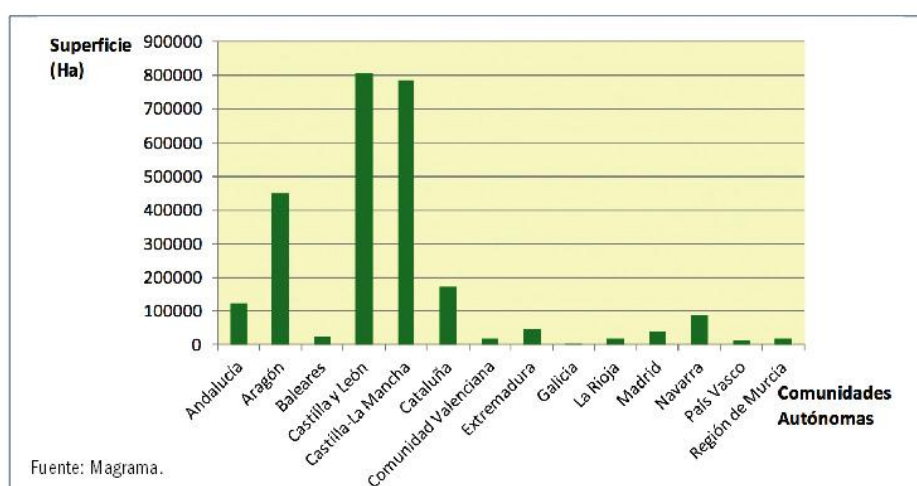
Així mateix, aquest és el cultiu que ocupa una major superfície de sòl agrícola a nivell nacional pel que fa a espècies anuals de producció extensiva. Segons dades del Magrama l'àrea conreada la temporada del 2015-16 va ser de 2.662.200 hectàrees.



Gràfic 1.1 Evolució de la superfície dedicada al cultiu d’ordi en Espanya entre el 2004 i el 2016.

L’ordi ha estat ocupant tradicionalment les superfícies cerealistes amb menys potencial i pitjors condicions de cultiu. No és casual, per tant, la gran superfície que dedica Espanya al cultiu, ja que les condicions d’escassa pluviometria i terres de baixa qualitat en bona part de la superfície nacional fa idoni aquest cereal pel cultiu.

La distribució geogràfica de la superfície de cultiu dedicada a l’ordi a Espanya reflecteix d’alguna manera aquesta situació al concentrar-se el cultiu principalment en els secans d’ambdós altiplans (61,11%) i Aragó (17,23%).



Gràfic 1.2 Distribució de la superfície de cultiu d’ordi per comunitats autònomes. Campaña 2015.entre el 2004 i el 2016.

Si bé la majoria de les varietats més sembrades actualment són relativament modernes, no deixa de sorprendre la superfície dedicada encara al cultiu de varietats antigues que han mostrat i segueixen mostrant una magnífica adaptació a determinades zones del territori regional.

Recentment s’han introduït varietats d’ordi híbrides que aporten una sèrie de característiques diferencials respecte al cultiu de les varietats tradicionals. Aquest tipus de varietats ja porten diversos anys en explotació en països europeus com França o el Regne Unit on poden desenvolupar totes les seves potencialitats, i en què han anat incrementant la seva superfície fins arribar a quotes entre el 10% i el 20% del total dedicat a l’ordi.

Es tracta de varietats d’elevat potencial productiu que requereixen, al seu torn, condicions de cultiu d’alt potencial o de regadiu per poder desenvolupar al màxim les seves possibilitats.

1.4.2 Catalunya

A Catalunya, l’ordi també és el principal cultiu. La producció d’ordi es concentra a les Terres de Ponent i a les planes de la Catalunya Central.

Aquesta major presència del cultiu d’ordi es pot relacionar amb la importància del sector ramader a Catalunya, així com que els cultius s’han simplificat cap a cultius cerealistes i que el cultiu d’ordi es pot cultivar seguit en una mateixa parcel·la sense que en baixi sensiblement el rendiment, circumstància que no es dona en el cas del blat.

L’any 2016 a Catalunya es van conrear 178.676 hectàrees d’ordi, sent Lleida la província amb més superfície de cultiu (IDESCAT, 2016).

1.5 Usos

El principal ús del gra d'ordi és per a l'alimentació animal, també es destinen a aquesta els subproductes del procés d'obtenció de la cervesa (bagàs) i de destil·lació.



***Figura 1.9** Vaques menjant fenc (derivat de l’ordi).*

El segon ús més important és la producció de malta. El maltatge és un procés aplicat als grans de cereal, on aquests grans es fan germinar i s'assequen ràpidament després del creixement de la planta.

La malta s'utilitza per fabricar cervesa, whisky i vinagre de malta. Els grans maltats desenvolupen els enzims, α -amilasa i la β -amilasa, que es necessiten per convertir el midó del gra en sucre (glucosa).

L'ordi és el cereal maltat més comú, a causa del seu alt contingut en enzims. Es poden maltar d'altres grans, encara que la malta resultant potser no té prou contingut enzimàtic per a convertir el seu propi contingut de midó de manera completa i eficient.

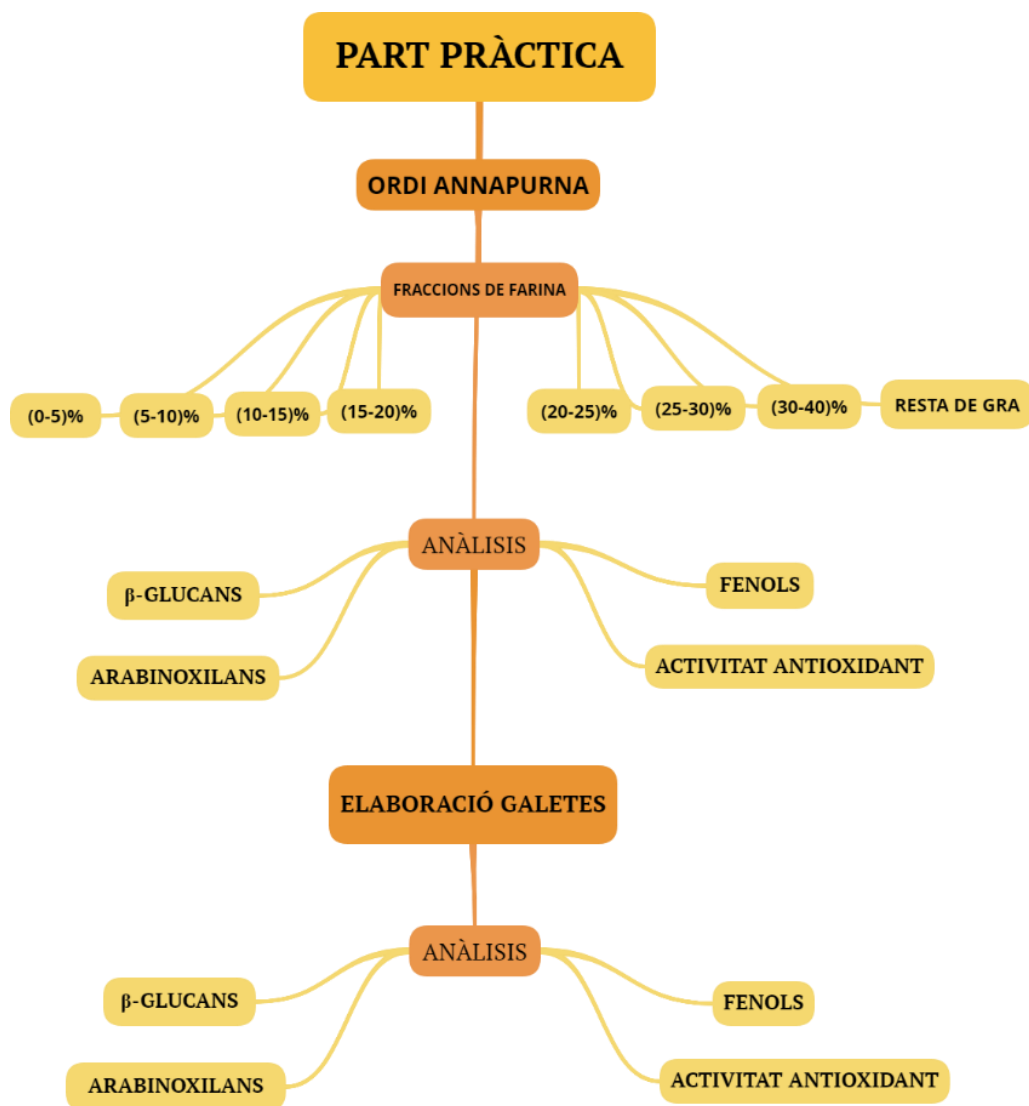
Recentment i gràcies a les investigacions portades a terme en els darrers anys, països com Estats Units i Canadà van desenvolupar varietats amb alt contingut en β -glucà per utilitzar la farina d'ordi per l'elaboració d'aliments funcionals que puguin aportar beneficis per la salut.

2. Part pràctica

La hipòtesi principal a comprovar en aquest treball és la possibilitat de dissenyar aliments amb propietats funcionals específiques utilitzant diferents parts del gra de l'ordi.

Per tal de corroborar aquesta hipòtesi, utilitzarem el mètode del perlat per obtenir diferents capes del gra d’ordi que seran analitzades pel seu contingut en compostos bioactius, en concret β -glucans, arabinoxilans, fenols, lliures i lligats, i també l’activitat antioxidant. Posteriorment se seleccionaran les fraccions més enriquides en alguns d’aquests compostos i s’elaboraran diferents tipus de galetes. Finalment, aquestes galetes seran analitzades per comprovar si poden ser funcionals d’acord a la seva composició.

L’esquema següent resumeix el procés a seguir en aquesta part del Treball de Recerca:



2.1 Mètode del perlat

Per tal de fer els anàlisis primer de tot s’ha de preparar les farines. El mètode del perlat ens permet obtenir només aquella fracció del gra d’ordi que volem analitzar aïllant-la de la resta de material vegetal.

Aquest mètode del perlat es porta a terme mitjançant la perladora, una màquina que a través de la fricció elimina progressivament les capes externes del gra.



Figura 2.1 Perladora, Satake Test Mill, TMO5C(2)-T.

El grau del perlat, generalment indicat com a percentatge, fa referència a la quantitat del gra eliminat durant el processament.

A Estats Units i Canadà, per exemple, un 30% de perles significa que s'elimina el 30% del pes original, deixant el 70% com l'ordi perlat. A Japó, el mateix producte es diu 70% perlat (Yeungand Vasanthan 2001).

En aquest treball mantenim els percentatges que proposen els Estats Units i Canadà.

Per a realitzar els nostres anàlisis hem determinat que les fraccions a obtenir mitjançant el perlat del gra siguin : (0-5)% , (5-10)% , (10-15)% , (15-20)% , (20-25)% (25-30)% , (30-40)% i la resta del gra que queda del perlat (40-100)%.

Cada fracció fa referència a la seva posició en el gra d’ordi, tal que el 0% es refereix a la capa més externa i la “resta de gra” a la porció que queda després de perlar el 40% del gra.

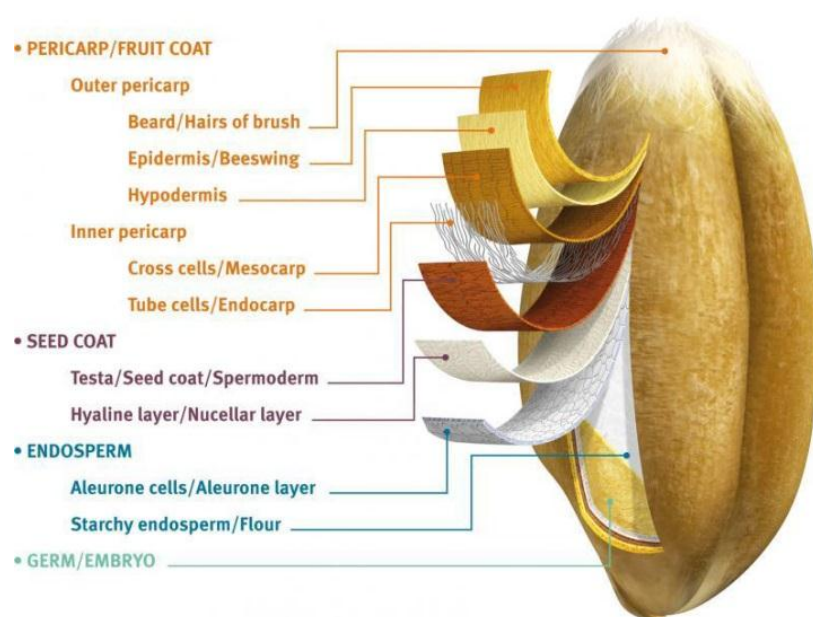


Figura 2.2 Capes o cobertes del gra d’ordi.

Les fraccions (0-5)% (5-10)% pertanyen al pericarpí o testa del gra d’ordi, les de (10-15)%, (15-20)% i (20-25)% formen part de l’aleurona, subaleurona i embrió respectivament, mentre que les de (25-30)% i (30-40)% ja són de l’endosperma del gra d’ordi.

2.1.1 Procés de perlat

Primer de tot s’ha de tamisar l’ordi de gra nu per tal d’obtenir grans amb les mateixes mides, i descartar aquells inferiors a 2.5mm, i es pesen 200g d’ordi tamisat.



Figura 2.3 Tamisant ordi amb tamís de 2.5mm (FILTRA).

Aquest ordi tamisat i pesat s’aboca a la perladora, que té una capacitat màxima de 100 g. El temps en què la perladora perla una fracció ja ha estat calculat prèviament mitjançant el mètode prova-error.

Gràcies a això sabem que en un temps de 30 s la perladora és capaç de perlar el 5% del gra d’ordi, així doncs, per aconseguir la primera fracció (0-5)% deixarem actuar la perladora 30 s, posteriorment retirarem la fracció perlada i la anirem recollint apart; en un altre compartiment la perladora abocarà el gra que queda després del perlat, aquest el pesem i ens hauria de donar 95 g aprox. ja que només perlem un 5% de 100 g.

De la mateixa manera repetim el procés aprofitant la resta de gra que ens queda després del primer perlat i perlem el gra 30 s més per aconseguir la fracció de (5-10)%, recollim la fracció perlada i continuem treballant amb el gra perlat restant. Entre cada fracció la perladora es neteja bé per no contaminar la següent fracció i consegüentment els anàlisis que realitzarem posteriorment.

Aquest procés el repetim fins arribar a la fracció (30-40)% on a diferència de les anteriors deixarem a la perladora actuar uns 60s ja que perlem un 10% del gra.



Figura 2.4 Farines corresponents a les fraccions del gra d’ordi.

Un cop obtingudes les fraccions passem a moldre-les en un molí amb un garbell de 0,5mm per aconseguir una substància més homogènia i sense imperfeccions. A més a més de les fraccions: (0-5)% , (5-10)%, (10-15)%, (15-20)% i resta del gra, també passem pel molí blat blanc, blat integral i ordi de la varietat *Annapurna* que analitzarem per fer la comparació.



Figura 2.5 Molí Cyclotek.

2.2 Anàlisi de compostos bioactius: Farines

2.2.1 Quantificació de β -glucans

En aquesta analítica el que pretenem és quantificar el contingut en β -glucans de les nostres mostres.

Per portar a terme aquest procés utilitzem un mètode colorimètric, emprant el reactiu glucosa oxidasa-peroxidasa (GOPOD), proporcionat pel kit d’assaig K-BGLU 02/17 de Megazyme, reactiu d’alta puresa que s’utilitza per al mesurament D-glucosa de manera específica en extractes de materials vegetals o aliments.

Primerament es porta a terme la hidròlisi dels polímers de β -glucans:

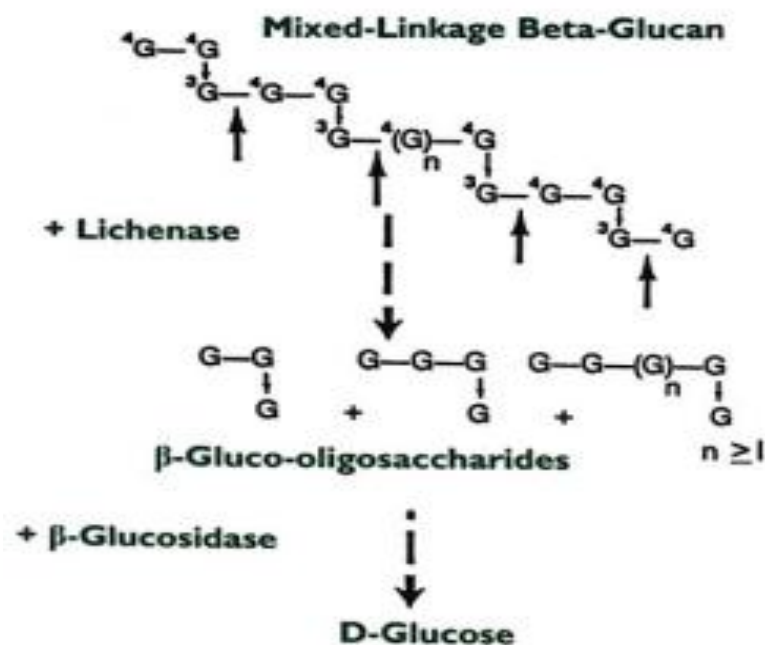


Figura 2.6 Procés d’hidròlisi del polímer de β -glucà, per obtenir finalment molècules lliures de glucosa.

Aquesta hidròlisi comença amb la disgregació de la mostra i l’addició d’etanol 50% (v/v), seguidament s’adequa la mostra per a la posterior acció del primer enzim, afegint un tampó fosfat de sodi a pH 6,5 i posant les mostres en un bany a 50°C. Aquest enzim és la Lliquenasa i és la que trenca les ramificacions del polímer de β -glucà.

Una alíquota del filtrat posterior es fa reaccionar amb el segon enzim, la β -Glucosidasa, que acaba de trencar les molècules provinents de la reacció del primer enzim i dóna lloc a molècules de glucosa lliures. Aquestes molècules de glucosa són les que mesurarem mitjançant el reactiu de GOPOD.

Aquesta reacció es produeix gràcies a que el GOPOD conté un enzim que transforma la D-glucosa en una molècula rosada (de color rosa) i a través de l’espectrofotòmetre podem arribar a mesurar la concentració d’aquestes molècules.

Les reaccions que tenen lloc són les següents:

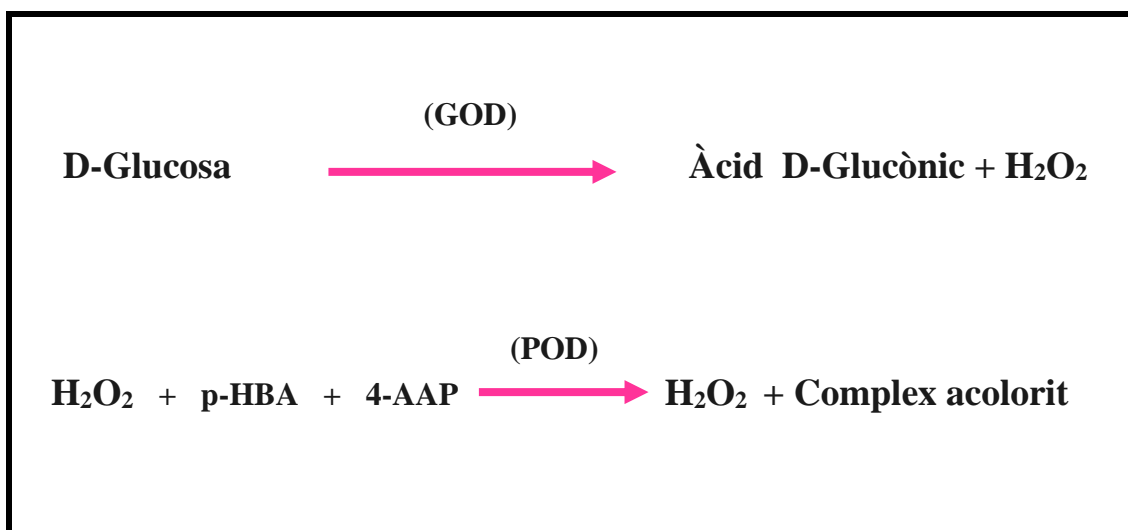


Figura 2.7 Reacció que porta a terme el reactiu GOPOD el qual té com a substrat la glucosa de les mostres.

La glucosa reacciona amb el reactiu enzimàtic que conté una barreja dels enzims Glucosa Oxidasa (GOD) i Peroxidasa (POD). En la primera etapa la glucosa és oxidada a Ac. Glucònic per l’acció de la enzim GOD, alliberant-se com a producte H_2O_2 , el qual en una reacció intervinguda per l’enzim POD, reacciona amb l’Ac. p-hidroxibenzoic i 4-aminoantipirina produint-se un compost acolorit, en quantitat proporcional a la quantitat de glucosa present en la mostra.

Per fer la mesura s'utilitza l'espectrofotòmetre, emprant un raig de llum d'una longitud d'ona de 510 nm.

Per portar a terme aquest anàlisi s'han utilitzat els següents materials, equips i reactius:

Material

- Tubs de plàstic Falcon amb tap de rosca de 15 ml .
- Tubs de plàstic Falcon amb tap de rosca de 50 ml.
- Micropipetes per dispensar 100 i 200 µl.
- Pipeta de 10 ml.
- Pipeta electrònica.
- Recipients de ceràmica.

Equips

- Molí (*Ciclotek*).
- Bany a 100°C i bany a 50°C .
- Agitador (*Vortex Mixer*).
- Centrífuga (*Eppendorf 5804*).
- Espectrofotòmetre (*JENWAY 6300*).
- pH-metre.
- Bàscula de precisió.
- Estufa.

Reactius

- Etanol 50% (v/v)
- Tampó fosfat de sodi 20 mM pH 6,5. Per preparar-lo cal dissoldre 3,12 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ en 900 ml d'aigua destil·lada, ajustar el pH a 6,5 amb NaOH 100 mM i s'ajustar el volum a 1 L. Conservar en un refrigerador. La preparació és estable per dos mesos i es conserva a 4°C.
- Tampó acetat de sodi 200 mM pH 4. Per preparar-lo cal afegir 11,6 ml d'àcid acètic glacial a 900 ml d'aigua destil·lada. S'ajusta el volum a 1 L. La preparació és estable per dos mesos i es conserva a 4°C.

- Tampó acetat de sodi 50 mM pH 4. Per preparar-lo s’afegeix 2,9 ml d’àcid acètic glacial a 900 ml d’aigua destil·lada. S’ajusta el volum 1 L. Així mateix s’aboca també 0,2 g d’azida sòdica. La preparació és estable per dos mesos i es conserva a 4°C.

Reactius proporcionats per Kit K-BGLU 02/17 de Megazyme:

- Liquefasa: es dissol 1 ml de liquefasa (50 U) en 20 ml amb tampó fosfat de sodi pH 6,5. Conservar al congelador.
- β -glucosidasa: es dissol 1 ml de β -glucosidasa (20 U) en 20 ml amb tampó d’acetat de sodi 50 mM pH 4. Conservar al congelador.
- Solució estàndard de glucosa (1 mg/ml de glucosa en àcid benzoic al 0,2%).
- Reactiu de color, glucosa oxidasa-peroxidasa (*GOPOD*):
 - 1- Solució **I**: es dissolen 24,8 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 12,43 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 3,01 g d’àcid p-hidroxibenzoic i 4,01 g d’àcid benzoic en 1800 ml d’aigua destil·lada. Aforar a 2 litres. Conservar en un refrigerador.
 - 2- Solució **II**: solució de glucosa oxidasa 6250 U/ml. Es dissol el contingut d’un recipient de 25.000 U en 4 ml d’aigua destil·lada i s’afegixen 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ per estabilitzar-la. Conservar en un refrigerador per sota de 4°C.)
 - 3- Solució **III**: peroxidasa.
 - 4- Solució **IV**: es dissolen 0,05 g de 4-amino-antipirina en 2,5 ml d’aigua destil·lada. Aquesta solució ha de ser preparada just abans de preparar la solució de treball.
 - 5- Solució de **treball** (*GOPOD*): es barregen les solucions anteriors en les següents proporcions: 2.000:2:1:10. Tapem amb paper d’alumini el recipient que el conté perquè es un reactiu fotosensible¹⁰.
- Farina control d’ordi (humitat 10,9 %) (4,1 % β -glucans). Conservar a temperatura ambient.

¹⁰ El *GOPOD* és fotosensible, perd eficàcia a causa de la llum.



Figura 2.8 Reactius del Kit K-BGLU 02/17 de Megazyme, Farina control ordi (esquerra) i Glucosa estàndard (dreta).

Procediment

- 1- Primer de tot es perla el gra d’ordi prèviament tamisat, i es recullen les fraccions següents: (0-5)% , (5-10)%, (10-15)%, (15-20)%, (20-25)% (25-30)%, (30-40)% i la resta del gra que queda del perlat (40-100)%, regulant el temps segons convingui (cada 30 s perla un 5 %).
- 2- Es passa pel molí (Cyclotek) totes les fraccions del gra i a més a més també blat blanc, blat integral i farina d’Annapurna (gra sencer) per eliminar impureses i obtenir una substància homogènia.
- 3- Amb una bàscula de precisió es pesen 100mg de cada mostra en tubs de plàstic amb tap de rosca de 15 ml, tipus Falcon.
- 4- A totes les mostres s’afegeixen 200 µl d’etanol 50% (v/v).
- 5- Tot seguit, s’aboca 4ml de fosfat de sodi 20mM, pH 6,5 , per començar a adequar la mostra per a la posterior acció del primer enzim (Liquenasa). Es dona un punt de vòrtex per barrejar bé la mescla.
- 6- A continuació, s’incuben les mostres en el bany a 100°C durant un minut. Després del minut es vortegen, es tornen al bany de 100°C i es deixen 2 minuts més, posteriorment es dona un altre punt de vòrtex. Aquest pas serveix per disgregar la mostra i fer més accessible els polímers de β -glucà a l’enzim que actuarà posteriorment.

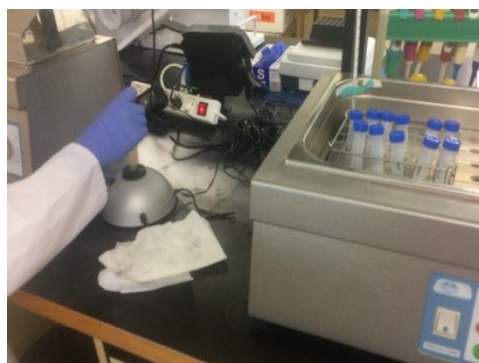
- 7-** Es treuen les mostres del bany de 100°C i es passen al bany de 50°C, temperatura idònia perquè puguin actuar els enzims. Es deixen en el bany durant 5 min.
- 8-** Sense treure les mostres del bany de manera que no disminueix la temperatura s’afegeixen 200 µl del primer enzim, Liquenasa (10U) a totes les mostres.



***Figura 2.9** Bany de 50° C.*

- 9-** Ara sí, es tapen els tubs un cop afegit l’enzim i se’ls hi dona un punt de vòrtex, tot seguit es tornen al bany de 50°C i s’incuben durant una hora. Durant aquesta hora s’haurà d’agitar les mostres cada 15min per garantir que l’enzim té contacte amb tota la mostra.

- 10-** Després d’1h s’afegeix 5ml d’acetat de sodi 200 Mm pH 4 a totes les mostres i s’agiten utilitzant el Vòrtex.



- 11-** Posteriorment es deixen temperar a temperatura ambient durant 5 min.

***Figura 2.10** Punt de vòrtex cada 15 min.*

- 12-** Un cop temperades es centrifuguen 10 min a 2360 rpm. En aquest temps es prepararan els tubs de plàstic de 15 ml on s’hi abocarà la mostra ja hidrolitzada (per la Liquenasa) i el segon enzim, la β -Glucosidasa.

- 13-** Tot després de treure les mostres de la centrífuga es dispensen 100 µl de mostra als tubs que han estat preparats prèviament. De cada mostra hi ha tres tubs, dues repeticions a les quals s’hi afegeix 100 µl del segon enzim (β -Glucosidasa) i un blanc al qual només s’hi aboca 100 µl de mostra i 100 µl d’acetat de sodi 50 mM pH 4.



***Figura 2.11** Centrifuge*

5804, eppendorf. 36

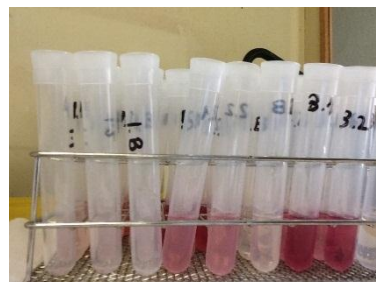
- 14-** A més a més es preparen quatre tubs de la glucosa estàndard, afegint 100 µl de glucosa estàndard proporcionada pel Kit més 100 µl d’acetat de sodi 50 mM pH 4.

Aquestes mostres són les que ajudaran a extrapolar el contingut de β -glucans de les nostres mostres, ja que de la glucosa estàndard es coneix el contingut de β -glucans i amb l’espectrofotòmetre calculem l’absorbància, i través d’un factor de conversió s’obté el contingut en β -glucans de les mostres.

Així també es prepara el **Blanc general** amb el que es “tararà” l’espectrofotòmetre quan es calculi l’absorbància; per fer-ho s’afegeix 100 µl d’H₂O i 100 µl d’acetat de sodi 50 mM pH 4 al tub.

- 15-** Es tornen a incubar les mostres en el bany de 50° C 10 min per a que l’enzim β -Glucosidasa pugui actuar hidrolitzant les molècules obtingudes de la reacció de la Liquenasa i donant lloc a molècules de glucosa. El tub “blanc” de cada mostra al qual no hi afegim el segon enzim ajudarà a descartar aquella glucosa que no prové de la hidròlisi dels enzims i que es trobava de forma lliure en les mostres.

- 16-** S’afegeix 3 ml del reactiu GOPOD a totes les mostres (estàndard glucosa i Blanc general inclosos) i es tornen a incubar 20 min en el bany de 50° C.



***Figura 2.12** Mostres amb el reactiu GOPOD.*

- 17-** Finalment s’aboca el contingut dels tubs en cubetes aptes per a la lectura de l’espectrofotòmetre. Aquest retornarà el valor de l’absorbància.

Per tarar l’aparell s’utilitza el Blanc general que s’ha preparat amb anterioritat. De cada mostra s’obtenen dues absorbàncies, de les quals es fa una mitjana i se li resta el valor del blanc de cada mostra.



***Figura 2.13** Espectrofotòmetre.*

A més a més calculem la **humitat relativa** de totes les mostres ja que l’aigua que contenen pot fer variar el resultat. Per calcular-la hem seguit aquest procediment:

- 1- Es pesen 0,5 g aprox. de cada mostra de farina en un recipient de ceràmica, i s’anota el pes total (recipient inclòs).
- 2- S’introdueixen els recipients en una estufa a 80 °C durant 20 hores.
- 3- Es retiren els recipients i es deixen temperar en un assecador durant un temps d’entre 15-30 min, perquè no tornin a agafar humitat.



Figura 2.14 Estufa a 80°C.

- 4- Finalment es tornen a pesar els recipients amb les farines, tenint en compte el pes del recipient sense contingut.
- 5- Per calcular la humitat relativa, seguim la fórmula següent:

$$\text{Humitat relativa} = \frac{\text{pes inicial} - \text{pes final}}{\text{pes inicial}} \cdot 100$$

El percentatge d’humitat relativa de cada mostra serà imprescindible pels càlculs de cada anàlisi que es portarà a terme.

Càlculs¹¹

Per determinar la quantitat de β -glucans de les nostres mostres hem utilitzat una plantilla **Mega-CalcTM** d’Excel proporcionada per la casa Megazyme descarregada des de la pàgina web (www.megazyme.com).

¹¹ Veure **Annex I**. Full de càlcul “Quantificació de β -glucans;”.

Tot i així també es pot calcular mitjançant la fórmula següent:

$$\begin{aligned}\beta - glucans (\% w/w) &= \Delta A \times F \times \frac{FV}{0.1} \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} \times D \\ &= \Delta A \times \frac{F}{W} \times FV \times D \times 0,9\end{aligned}$$

On:

ΔA = l’absorbància després del tractament amb la β -Glucosidasa (reacció) menys l’absorbància del blanc de cada mostra.

F = factor de conversió dels valors de l’absorbància a μg de glucosa.

$$= \frac{100 (\mu g \text{ de D-glucosa})}{\text{absorbància de } 100 \mu g \text{ de D-glucosa}}$$

FV = Volum final (9,4ml per la farina d’ordi)

0.1 = Volum de mostra analitzat.

$1/1000$ = conversió de μg a mg.

$100/W$ = factor que expressa el contingut en β -glucans en percentatge en relació amb el pes de la mostra.

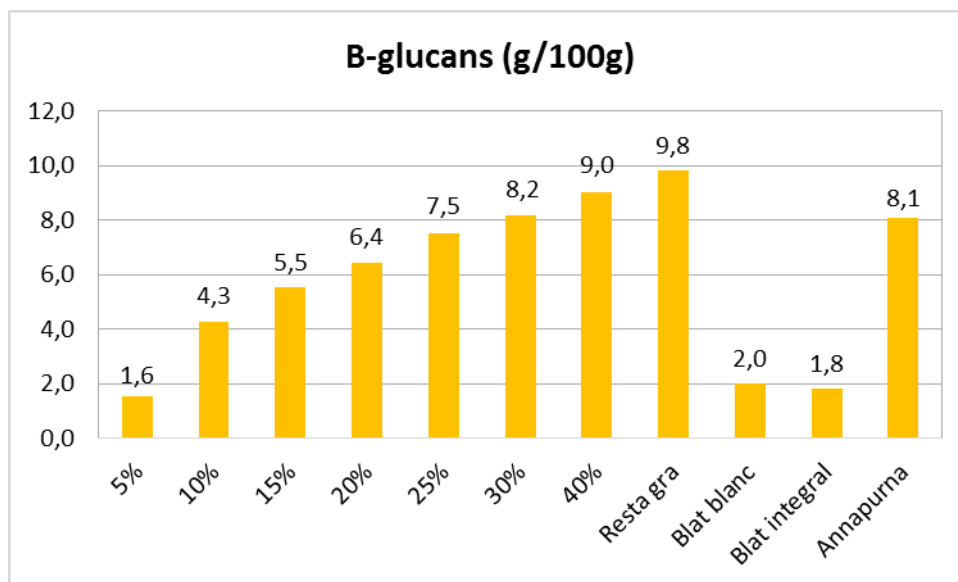
W = el pes en mg de la mostra analitzada (pes sec).

$162/180$ = Factor per convertir les molècules lliures de D-glucosa en anhidro-D-glucosa.

D = factor de dilució si s’ha diluït la mostra (és opcional).

Resultats

En el gràfic següent podem observar els resultats obtinguts de la quantificació de β -glucans de les fraccions del gra d’ordi, la resta del gra sense perlar, blat blanc, blat integral i farina d’*Annapurna* (gra sencer):



Gràfic 2.1 Contingut en β -glucans (g/100g) de les mostres que s’indiquen.

Com podem observar en la gràfica de resultats de la quantificació de β -glucans, aquest compost bioactiu és força abundant en les fraccions més internes del gra d’ordi, sobretot en les fraccions de 30%, 40% i resta de gra. En canvi, en les fraccions més externes com les del 5%, 10% i 15% són les que tenen menys g/100 g de farina, tot i així els valors més baixos pertanyen a les dues varietats de blat que no superen els 2 g/100 g de farina.

D’altra banda, la farina d’*Annapurna* amb 8,1 g/100 g destaca també pel seu alt contingut en aquest compost, tot i que no arriba als 9,8 g/100 g de farina de la mostra de resta de gra.

Una altra apreciació que podem fer és com va variant el contingut en β -glucans de les mostres; podem observar com a mesura que anem avançant cap a l’interior del gra (fraccions més internes) el contingut en aquest compost també augmenta, tal que en la capa més externa, 5%, partim de 1,6 g/100 g de farina i quan ja estem a la resta de gra assolim els 9,8 g/100 g, un augment força important i que serà decisiu a l’hora de triar les fraccions per elaborar les galetes.

Per resumir, podem dir que tot i que la farina d’Annapurna ja té un alt contingut en β -glucans, si només barregem farines de les fraccions més internes del gra d’ordi podríem assolir valors superiors. Així doncs, és deduïble que per elaborar una galeta rica en β -glucans, seleccionarem fraccions internes del gra d’ordi.

2.2.2 Quantificació d’Arabinoxilans

Per determinar la quantitat d’arabinoxilans d’una mostra hem utilitzat el mètode espectrofotomètric descrit pel Kit D-Xilosa (Magazyme).

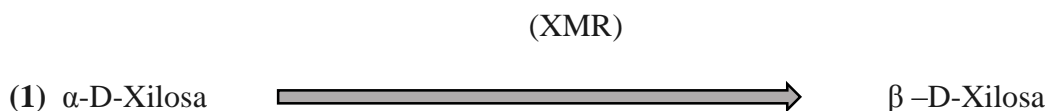
El Kit de prova D-xilosa és un mètode per mesurar la quantitat de D-xilosa en extractes de plantes. Seguidament es calcula el contingut en arabinoxilà (g/100 g) mitjançant factors de conversió específics per l’ordi.



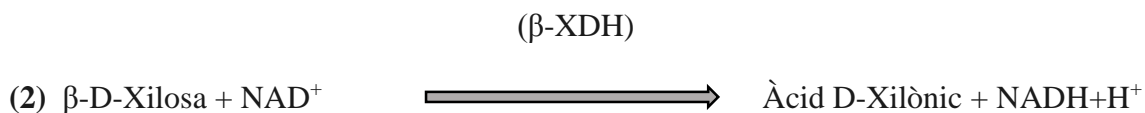
Figura 2.15 D-Xylose Assay Kit, Magazyme.

El principi en el que es basa el Kit per fer els anàlisis és el següent:

La interconversió de les formes α - β i β -anomèriques de la D-xilosa que se catalitza per la xilosa mutarotasa (XMR) (1).



La β -D-Xilosa s’oxida mitjançant NAD^+ a àcid D-xilònic en presència de β -xilosa deshidrogenasa (β -XDH) a pH 7,5 (2).



La quantitat de NADH formada en aquesta reacció és estequiomètrica a la quantitat de D-Xilosa. És el NADH el que es mesura gràcies a l’augment de l’absorbància a 340 nm.

Com que la longitud d’ona del raig de llum que utilitza l’espectrofotòmetre per fer la lectura es troba fora de l’espectre visible, per a portar a terme aquesta analítica utilitzarem

una microplaca de quars per evitar els resultats erronis que es donarien amb una microplaca de plàstic convencional.

Les mostres amb les quals s’efectuarà aquest anàlisi són les fraccions del gra d’ordi obtingudes prèviament amb la perladora: (0-5)% , (5-10)%, (10-15)%, (15-20)%, (20-25)% (25-30)%, (30-40)% i la resta de gra sobrant del perlat. A més a més s’analitzarà també el contingut en arabinosilans de mostres de blat blanc, blat integral i farina d’Annapurna.

Per portar a terme aquest anàlisi s’han utilitzat els següents materials, equips i reactius:

Material

Extracció

- Tubs de Falcon de 50 ml.
- Eppendorf de 1,5 ml.
- Pipetes.
- Material d’ús general.

Anàlisi

- Microplaca de quars.
- Micropipetes.
- Micropipetes multicanal.
- Material d’ús general.

Equips

- Molí centrífug (Cyclotek 1093).
- Balança de precisió.
- Agitador tipus Vòrtex .
- Centrífuga (Eppendorf 5804).
- Espectrofotòmetre de plaques per lectura en espectre visible (Termo Scintific Multiskan GO).



Figura 2.16 Agitador tipus Vòrtex, Genie 2.

Reactius

Extracció

- Àcid clorhídric (HCl) riquesa CoA:37%. Scharlab, referència AC07301000, 1 L. Per preparar-ho es dilueixen 5,4 ml de HCl 37% en 44,6 ml de H₂O destil·lada per obtenir un volum total de 50 ml de HCl 1,3M (mol/L). Aquesta dissolució es mantindrà a temperatura ambient i en la foscor.
- Hidròxid de sodi (NaOH). Per preparar-ho es pesen 2,6 g de NaOH i es dissolen en 50 ml de H₂O destil·lada. Aquesta dissolució es mantindrà a temperatura ambient.

Anàlisi

Els reactius per a la determinació analítica estan disponibles en format kit per la casa Megazyme. Un kit conté 6 flascons amb els reactius necessaris per 1000 determinacions en format microplaca:

- Flascó 1 : Tampó (45 ml, pH 7,5) més azida sòdica (0,02% w/v) com a conservant. Estable durant 2 anys a 4°C.
- Flascó 2: (x2) NAD⁺ més ATP. Pols liofilitzat. Estable durant 5 anys a -20°C.
- Flascó 3: Suspensió de hexoquinasa (2,2 ml). Estable durant 2 anys a 4°C.
- Flascó 4: Solució XDH/XMR (5,6 ml). Estable durant 2 anys a -20°C.
- Flascó 5: Solució estàndard de D-Xilosa (5 ml, 0,25 mg/ ml). Estable durant 2 anys a 4°C.



Figura 2.17 Flascons proporcionats pel Kit de Megazyme.

Procediment

1. Primer de tot, es perlen 200 g d’ordi tamisat. Les fraccions que s’obtenen són: (0-5)%, (5-10)%, (10-15)%, (15-20)%, (20-25)%, (25-30)%, (30-40)%, i resta de gra.
2. Posteriorment es passen totes les fraccions, blat blanc, blat integral i farina d’Annapurna per un molí centrífug (Cyclotek 1093) amb un garbell de 0,5 mm. D’aquesta manera s’obtenen mostres sense impureses i amb partícules més homogènies.



Figura 2.18 Molí centrífug, Cyclotek 1093.

3. Amb una bàscula de precisió es pesen 50mg de cada mostra en un tubs falcon 50 ml. Per cada mostra es fan tres repeticions, per tant es pesa tres vegades la mateixa mostra. Per exemple de la fracció del (0-5)% s’obtenen: (0-5)% -1, (0-5)% -2 i (0-5)% -3.
4. S’afegeix 2,5 ml de HCl 1,3M a cada tub i es tapen. Gràcies a l’HCl es porta a terme una hidròlisi àcida en la que es trenquen els enllaços dels arabinxilans de tipus insoluble, els quals constitueixen aproximadament un 80% del contingut en total. L’altre 20% correspon als arabinxilans de tipus soluble.



Figura 2.19 HCl 1,3M.

5. Tot seguit es posen a incubar els tubs a 100°C durant una hora. Cada 15 min es treu tub per tub per donar-los-hi un punt de Vòrtex (agitar), d’aquesta manera no es disminueix la temperatura de tots els tubs a la vegada.



Figura 2.20 Punt de vòrtex cada 15min.

6. Una vegada ha passat l’hora es treuen tots els tubs i es deixen refredar a temperatura ambient (en una safata amb aigua freda).
7. Un cop refredats s’afegeix 2,5 ml de NaOH 1,3M a cada tub. Aquesta base s’afegeix per neutralitzar el medi de la mostra, és per això que el volum afegit és el mateix que l’àcid que s’ha emprat per fer la hidròlisi.
8. Per acabar de mesclar bé tots els reactius , es dóna un punt de Vórtex (agitar) a totes les mostres.

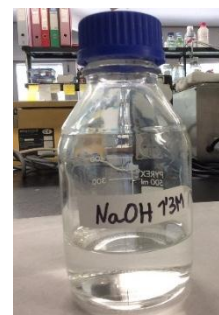


Figura 2.21 NaOH 1,3M.

9. Abans de posar els tubs a la centrífuga s’ajusta el volum a 50 ml amb aigua destil·lada, que ajudarà a solubilitzar els arabinosilans i tenir-los en un medi aquós per facilitar la seva extracció i posterior lectura. Tot seguit es torna a agitar el tubs amb les mostres.
10. Ràpidament després del Vórtex es passa 1 ml de cada mostra en eppendorf de 1,5 ml. De cada mostra hi ha tres repeticions.
11. Finalment es posen els tubs a la centrífuga a 5000 rpm durant 10 min.

Un cop enllestides les mostres per fer l’anàlisi es procedeix a muntar la microplaca. A continuació la taula resum del que s’ha afegit a cada pou:

Substància que afegim als pous de la microplaca	Blanc	Mostra	Estàndard
Aigua destil·lada (25° C)	0.210 ml	0.160 ml	0.2 ml
Mostra	-	0.050 ml	-
Solució estàndard	-	-	0.010 ml
Solució 1 (buffer)	0.04 ml	0.04 ml	0.04 ml
Solució 2 (NAD ⁺ /ATP)	0.04 ml	0.04 ml	0.04 ml

Suspensió 3 (Hexokinase)	0.002 ml	0.002 ml	0.002 ml
Mesclar tots els reactius afegits, llegir l’absorbància (340 nm) de les solucions (A1), després de 5 min començar la reacció amb l’addició de :			
Solució 4 (XDH/ XMR)	0.005 ml	0.005 ml	0.005 ml
Mesclar una altra vegada i llegir l’absorbància (340 nm) de les solucions (A2) al final de la reacció quan hagin passat 6min.			

***Taula 2.1** Quadre resum del muntatge de la microplaca, quantificació d’arabinoxilans.*

A causa de la presència de D-glucosa en les nostres mostres s’afegeix l’Hexokinase, un enzim que permet inhibir l’acció de la D-glucosa ja que aquesta també pot donar lloc a NADH perquè també presenta afinitat amb els enzims (XDH/ XMR). Per tant, d’aquesta manera garantim que tot el NADH final prové de la β -Xilosa i no de les molècules de glucosa.

Càlculs¹²

Primer de tot, es determina la diferència de les absorbàncies (**A2 - A1**) pel blanc i per la mostra. La primera absorbància (**A1**) és sense afegir els enzims (XDH/XMR) en canvi la segona absorbància (**A2**) és quan ja han estat afegits.

Tot seguit, sostraiem la diferència de les absorbàncies del blanc a la diferència d’absorbàncies de les mostres, obtenint així ΣA (D-xilosa) (increment de l’absorbància).

El valor de ΣA (D-xilosa) no pot ser major a 0.100 , perquè els resultats obtinguts siguin els més acurats possible.

¹² Els càlculs poden ser simplificats si s’utilitza el Megazyme *Mega-CalcTM*, que pot ser descarregat des de la pàgina web de Megazyme (www.megazyme.com).

La concentració de D-xilosa (g/l) es calcula mitjançant la fórmula següent:

$$\frac{g}{L} = \frac{\Delta A \text{ mostra}}{\Delta A \text{ estàndar}} \times \frac{g}{L} (\text{estàndar}) \times F$$

Si les mostres s’han diluït (no és el cas) en el procés de preparació, el resultat ha de ser multiplicat pel factor de dilució, F.

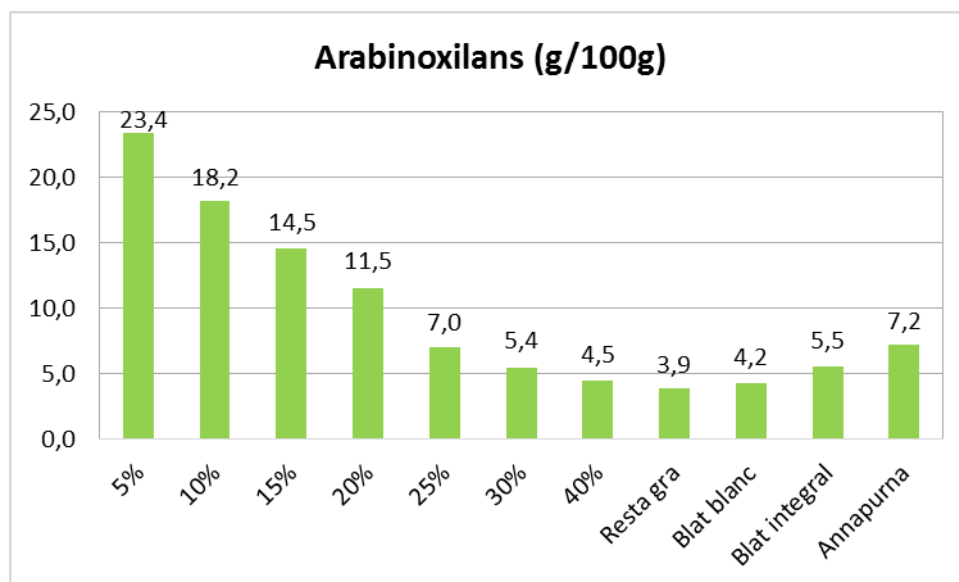
Seguidament es calcula el contingut en arabinoxilà (g/100 g) mitjançant factors de conversió:

$$\frac{g}{100g} = \frac{g/L (D - xilosa)}{g/L (pes mostra)} \times \frac{100}{59} \times 100$$

100/59: és un factor de conversió de D-xilosa a arabinoxilà. El valor 59 correspon en percentatge al contingut de D-xilosa present en el polímer de farina d’ordi.

Resultats

En el gràfic següent podem observar els resultats obtinguts de la quantificació d’arabinoxilans :



Gràfic 2.2 Contingut en arabinoxilà (g/100g) de les mostres que s’indiquen.

Com podem observar, els resultats de l’anàlisi anterior donen suport a la hipòtesi que plantejàvem al principi.

La presència d’arabinoxilans és abundant en les capes més externes del gra d’ordi tal que en les fraccions de 5% i 10% tenim valors propers a uns 20 g d’arabinoxilans/100 g de farina, un valor força alt comparat amb els resultats obtinguts del blat o de la farina d’Annapurna (gra sencer).

D’altra banda, com més ens anem endinsant en el gra d’ordi (fraccions corresponents a l’endosperma del gra) veiem com el contingut en arabinoxilans va disminuint fins assolir valors de 3,9g/100g de farina un valor fins i tot inferior al dels dos tipus de blat.

El contingut d’arabinoxilans dels dos tipus de blat no sobrepassa els 6g, i entre les dues varietats, el blat integral supera amb un 1g al blat blanc, tot i així, continuen tenint un baix contingut en aquest compost bioactiu.

Pel que fa a la mostra de farina d’Annapurna, tot i tenir un contingut en arabinoxilans de 7,2g/100g de farina, segueix presentant una gran diferència amb les fraccions més externes del gra d’ordi.

Per resumir, podem dir que perlant el gra d’ordi i obtenint fraccions de diferents percentatges del gra s’aconsegueix incrementar el contingut en arabinoxilans fins a tres vegades més, si es pren com a referència la fracció del 5% amb 23,4 g/100 g de farina i els 7,2 g/100 g de farina d’Annapurna.

2.2.3 Quantificació de fenols

Per determinar el contingut en fenols totals s’ha utilitzat el mètode de Folin-Ciocalteu, que es descriu com la metodologia per calcular el contingut en fenols totals i expressar-lo en una concentració equivalent d’una substància de referència (àcid gàl·lic).

El principi en el que es basa el mètode és que els compostos fenòlics s’oxiden per l’acció del reactiu Folin-Ciocalteu, que està format per una barreja d’àcid fosfotúngstic ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) i àcid fosfomolibdic ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) que es redueixen per l’acció dels fenols en una mescla d’òxids blaus de tungstè (W_8O_{23}) i de molibdè (Mo_8O_{23}).

La reacció produeix un compost de color blau. Com més gran és el contingut en compostos fenòlics més intens és el color blau, de manera que la mesura de l’absorbància a 760 nm és un indicador de la riquesa en fenols de la mostra. Els resultats se solen expressar en una concentració equivalent d’un compost de referència, que és l’ àcid gàl·lic.

Per portar a terme aquest anàlisi s’han utilitzat el següents materials, equips i reactius :

Material

Extracció

- Tubs eppendorf de 1,5 ml i 2 ml.
- Micropipetes.
- Agitador tipus vòrtex.
- Centrifuga (Sigma 113).
- Material d’ús general.

Anàlisis

- Microplaques (Plaques per espectrofotòmetre de 96 pous i transparents).
- Microplaques amb filtre niló 0.45µm.
- Micropipetes.
- Micropipetes multicanal.
- Material d’ús general.

Equips

- Balança de precisió.
- Agitador tipus vòrtex.
- Centrifuga (Sigma 113).
- Espectrofotòmetre de plaques per a lectura en espectre visible (Termo Scientific Multiskan GO).
- Bomba de buit.

Reactius

- Metanol (CH_3OH). Merck KGaA, referència: 1.06009.1000, 1L.
- Àcid fòrmic (CH_2O_2) CoA 98-100%. Scharlab, referència: AC10851000, 1L.
- Hidròxid de sodi (NaOH) referència prolabo.
- Àcid clorhídric (HCl) Riquesa CoA: 37%. Scharlab, referència AC07301000, 1L.
- Reactiu de Folin-Ciocalteu. Carlo Erba, Dasit Group. Lot T122154E, 500 ml.
- Carbonat de sodi anhidre (Na_2CO_3). Scharlab, referència: SO01160500, 500 g.
- Per a la corba patró s'utilitzarà l'àcid gàl·lic monohidrat ($\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$) d'elevada puresa com a substància de referència. Fluka, referència: 48630, 100 g.

A partir dels reactius esmentats, preparem les següents dissolucions que utilitzarem al llarg del procés:

- **Preparació de MeOH: H₂O: FA (79.5: 19.5: 1 v / v / v):** Diluir 79.5ml de metanol (MeOH) en 19.5 ml d'aigua destil·lada i afegir 1 ml d'àcid fòrmic (FA) per obtenir un volum total de 100 ml de MeOH: H₂O: FA (79.5: 19.5: 1 v / v / v).
- **Dissolució de NaOH 2M:** Pesar 4 g de NaOH i dissoldre'l en 50 ml d'aigua destil·lada.
- **Preparació de MeOH (0.1% FA):** Diluir 0,1 ml d'àcid fòrmic en 99.9 ml de metanol (MeOH) per obtenir un volum total de 100 ml de MeOH (0.1% FA).
- **Dissolució de carbonat de sodi al 10%:** Pesar 3 g de carbonat de sodi i dissoldre'l en 30 ml d'aigua destil·lada.

- **Dissolució de Folin-Ciocalteu:**

Encara que es pot preparar en el laboratori és recomanable l’ús d’una dissolució comercial. Si calgués preparar-la, aquest és el procediment:

- Dissoldre 700 ml d’aigua destil·lada en 100 g de tungstat de sodi ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) i 25 g de molibdè de sodi ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Afegir 50 ml d’àcid fosfòric del 85% ($\rho_{20} = 1.71 \text{ g / ml}$) 100 mL d’àcid clorhídric concentrat (1.19 g/ml). Portar a ebullició en un temps de 10 hores i afegir a continuació 150 g de sulfat de liti, algunes gotes de brom, i bullir de nou durant 15 minuts. Deixar refredar i enrasar a 1 L amb aigua destil·lada.

En aquest cas s’utilitza una **dissolució comercial de Folin-Ciocalteu** i es prepara una dilució del reactiu 1: 4 (v: v) amb aigua destil·lada.

Procediment

Abans de començar amb les etapes de l’anàlisi de les mostres, preparem la corba de calibrat a partir de la qual expressarem el contingut en fenols de les nostres mostres.

Per preparar la solució mare d’àcid gàl·lic: es pesen **P₀** (aproximadament 37.5 mg) d’àcid gàl·lic i es dissolen en un determinat volum **V₀** (10 ml) de metanol.

La concentració d’àcid gàl·lic cal adequar-la perquè els seus alíquotes ens proporcionin lectures en l’espectrofotòmetre en el rang de 0 a 0.5 (d’absorbància) , encara que preferiblement les lectures dels extractes hauran d’estar compreses entre 0.1 i 0.3 (d’absorbància).

Per calcular el volum a afegir en cada dissolució s’utilitza la següent fórmula:

$$C_0 \cdot V_0 = C_1 \cdot V_1$$

On :

C₀: és concentració inicial

V₀: és volum inicial

C₁: és concentració final

V₁: és volum final

A partir de la solució mare d’àcid gàl·lic (3.75 mg / ml) es preparen les següents dilucions:

- Recta per a l’extracte de **fenols lliures**:
 - **Dilució 1** (100 µg / ml): 27 µL solució mare + 973 µL MeOH (1 mL de volum final).
 - **Dilució 2** (80 µg / ml): 800 µL dilució 1 + 200 µL MeOH.
 - **Dilució 3** (60 µg / ml): 750 µL dilució 2 + 250 µL MeOH.
 - **Dilució 4** (50 µg / ml): 833 µL dilució 3 + 167 µL MeOH.
 - **Dilució 5** (40 µg / ml): 800 µL dilució 4 + 200 µL MeOH.
 - **Dilució 6** (20 µg / ml): 500 µL dilució 5 + 500 µL MeOH.
 - **Dilució 7** (10 µg / ml): 500 µL dilució 6 + 500 µL MeOH.

- Recta per a l’extracte de **fenols lligats** (s’utilitza metanol acidificat ja que el pH de l’extracte fenòlic lligat és pròxim a 1-2):
 - **Dilució 1** (160 µg / ml): 43 µL s.m + 973 µL MeOH:HCl (80:20 v/v) (1mL de volum final).
 - **Dilució 2** (140 µg / ml): 875 µL dilució 1 + 125 µL MeOH:HCl (80:20 v/v).
 - **Dilució 3** (120 µg / ml): 857 µL dilució 2 + 143 µL MeOH:HCl (80:20 v/v).
 - **Dilució 4** (100 µg / ml): 833 µL dilució 3 + 167 µL MeOH:HCl (80:20 v/v).
 - **Dilució 5** (80 µg / ml): 800 µL dilució 4 + 200 µL MeOH:HCl (80:20 v/v).
 - **Dilució 6** (60 µg / ml): 750 µL dilució 5 + 250 µL MeOH:HCl (80:20 v/v).
 - **Dilució 7** (40 µg / ml): 667 µL dilució 6 + 333 µL MeOH:HCl (80:20 v/v).
 - **Dilució 8** (20 µg / ml): 500 µL dilució 7 + 500 µL MeOH:HCl (80:20 v/v).
 - **Dilució 9** (10 µg / ml): 500 µL dilució 8 + 500 µL MeOH:HCl (80:20 v/v).

Un cop tenim preparada la recta es comença amb les etapes de l’anàlisi:

Extracció

- 1- Primer de tot, es pesen 50 mg de cada mostra de farina i es posen en tubs eppendorf de 1,5 ml.
- 2- Posteriorment, s’afegeix 1ml de solució d’extracció (MeOH, H₂O, àcid fòrmic (79,5:19,5:1 v/v/v)) a cada mostra (de cada mostra hi ha tres repeticions) per solubilitzar els fenols i facilitar l’extracció.
- 3- Tot seguit, es disposen en l’agitador tipus Vòrtex 10 min a 800 rpm.
- 4- Passats els 10 min es passen a la centrífuga a 9000 rpm durant 10 min més.
- 5- Després d’aquests passos en cada tub queda ben diferenciats el pellet del sobrenedant. Aquest sobrenedant és el que es va recollint en tubs de 15 ml i és on es troben els fenols lliures.



Figura 2.22 Centrífuga, Sigma 113.

- 6- Aquest mateix procés es repeteix dues vegades més i s’ajunten els sobrenedants.

D’altra banda, la matriu o pellet residual que queda de l’extracció de fenols lliures es sotmet a l’extracció de **fenols lligats**:

- 1- Al residu se li afegeix 2 ml de NaOH 2M que comença a trencar els enllaços del fenols lligats gràcies a una hidròlisi alcalina.
- 2- S’agiten les mostres 10 min en el Vòrtex permetent que el NaOH tingui contacte amb tota la mostra.



Figura 2.23 NaOH 2M.

- 3- Després, es deixen reposar els tubs amb les mostres 12 h a temperatura ambient perquè s’acabi de completar la hidròlisi.
- 4- Passades les 12 h se’ls hi dóna un punt de vòrtex i es centrifuguen a 9000 rpm durant 15 min.
- 5- Es transfereix 1ml de sobrenedant a tubs de 15 ml i s’ajusta el pH a 2 amb 200 μ L HCl 37% , ja que s’ha de neutralitzar la base alcalina afegida per fer la hidròlisi dels enllaços. Aquest pas es porta a terme en la campana de laboratori ja que el HCl 37% és molt tòxic. Seguidament es vortegen 2 min.
- 6- S’afegeix 1 ml de MeOH (0,1% àcid fòrmic) per solubilitzar els fenols i facilitar la seva extracció, i s’agiten el tubs 2 min més a 800 rpm.

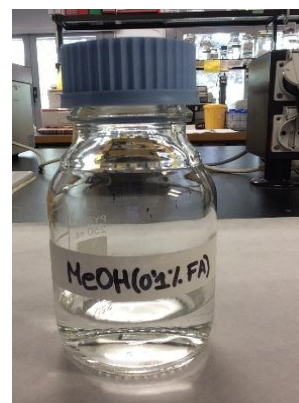


Figura 2.24 MeOH (0,1% FA).

- 7- Es passen les mostres a la centrífuga 10 min a 13000 rpm.
- 8- Posteriorment, es recull el sobrenedant (S1) en tubs de plàstic de 15 ml.
- 9- Es torna a afegir al residu 1 ml de MeOH (0,1% àcid fòrmic) i s’agita 2 min (800 rpm).
- 10- Es repeteix el mateix procés i es recull el sobrenedant (S2).
- 11- S’ajunten els dos sobrenedants obtinguts (S1+ S2) i es centrifuguen 4 min a 3700 rpm.



Figura 2.25 Sobrenedants (S1+ S2).

De l’extracció de compostos fenòlics s’obtenen dues fraccions: fenols **lliures** i fenols **ligats**, que s’analitzaran per separat per Folin-Ciocalteu.

Anàlisi colorimètric per Folin-Ciocalteu

Per realitzar l’anàlisi es munta una microplaca de la manera següent:

- 1- Es posa en cada pou de la microplaca 20 μ L de mostra o dilució d’àcid gàl·lic (recta).
- 2- Per als pous corresponents al blanc es posa; per fenols lliures 20 μ L de MeOH:H₂O:FA; per fenols lligats MeOH (0,1% d’àcid fòrmic, FA).

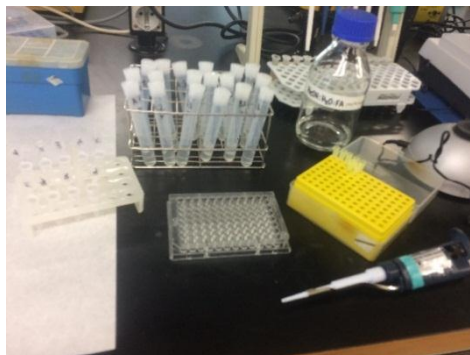


Figura 2.26 Muntatge de microplaca.

- 3- S’afegeixen 100 μ L del reactiu Folin-Ciocalteu diluït 1:4 (v/v). I es mescla bé el contingut de cada pou.
- 4- Es deixa reposar un parell de minuts la microplaca a temperatura ambient i s’afegeix 75 μ L de carbonat de sodi 10%. Gràcies a aquest s’adequa el medi per a que el reactiu Folin-Ciocalteu pugui actuar amb més eficàcia.



Figura 2.27 Dilució del Folin-Ciocalteu.

- 5- Posteriorment es deixa reposar la microplaca 90 min a temperatura ambient en completa foscor (es tapa amb paper d’alumini) perquè el Folin-Ciocalteu és fotosensible.
- 6- Passats els 90 min amb una pipeta multicanal es traspasa la totalitat del volum de cada pou de la microplaca a una altra microplaca amb filtres nylon 0,45 μ m.
- 7- Amb l’ajuda d’una bomba al buit es filtra el contingut de la microplaca a una altra microplaca neta.
- 8- Aquesta última microplaca és la que utilitzarem per posar-la a l’espectrofotòmetre i fer la lectura a 760 nm.



Figura 2.28 Bomba al buit.

Càlculs

Utilitzant les dades d’absorbància i concentració de la corba patró generem una recta de regressió lineal.

Ajustem les dades a una recta que passi per l’origen. Controlem la bondat de l’ajust per la R^2 , que ha de ser propera a la unitat.

Generem una expressió ($y = a + bx$) que ens permetrà calcular la concentració de les mostres equivalent a la substància de referència (àcid gàl·lic) .

Calculem la concentració d’àcid gàl·lic de les mostres (mg / ml) substituint l’absorbància de les mostres en l’equació:

$$\text{Concentració (en } \mu\text{g / mL)} = ((\text{Absorbància} - b) / a)$$

Posteriorment s’expressa el contingut en fenols totals en mil·ligrams d’àcid gàl·lic equivalent per gram de pes sec (mg GAE / g DW) mitjançant factors de conversió.

$$\frac{x \mu\text{g}}{\text{mL}} \times \frac{\text{ml}(\text{V.extracte})}{\text{g}(\text{pes-mostrà})} \times \frac{1 \text{mg}}{1000 \mu\text{g}} \times \frac{100}{100 - \text{humitat}} = \frac{\text{mg}(\text{GAE})}{\text{g}(\text{DW})}$$

On:

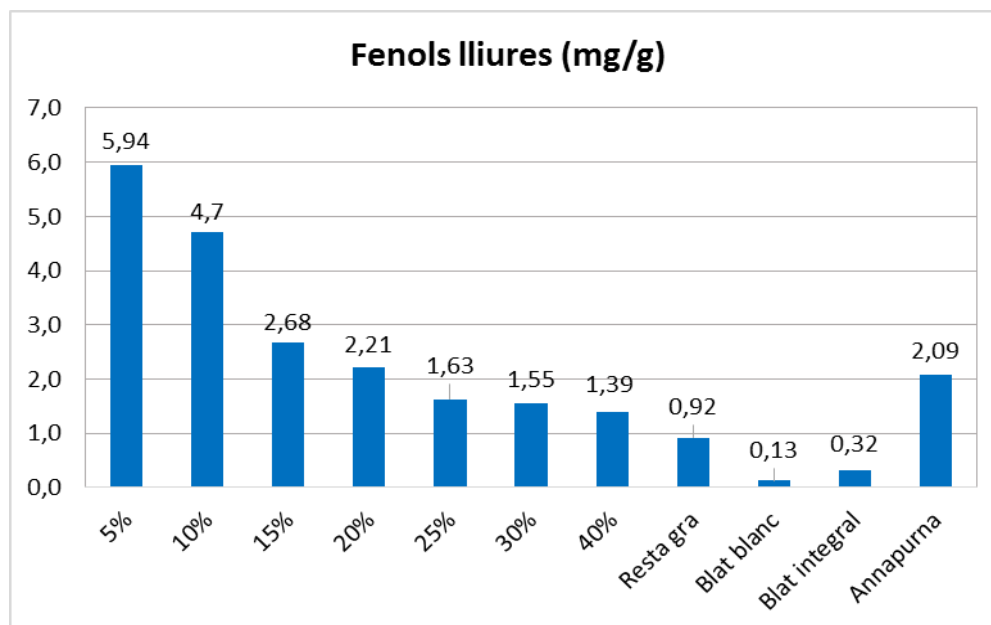
V. extracte: és el volum de l’extracte

GAE: és l’àcid gàl·lic

DW: pes total sec

Resultats

En el següent presenta els resultats de la quantificació de **fenols lliures**:



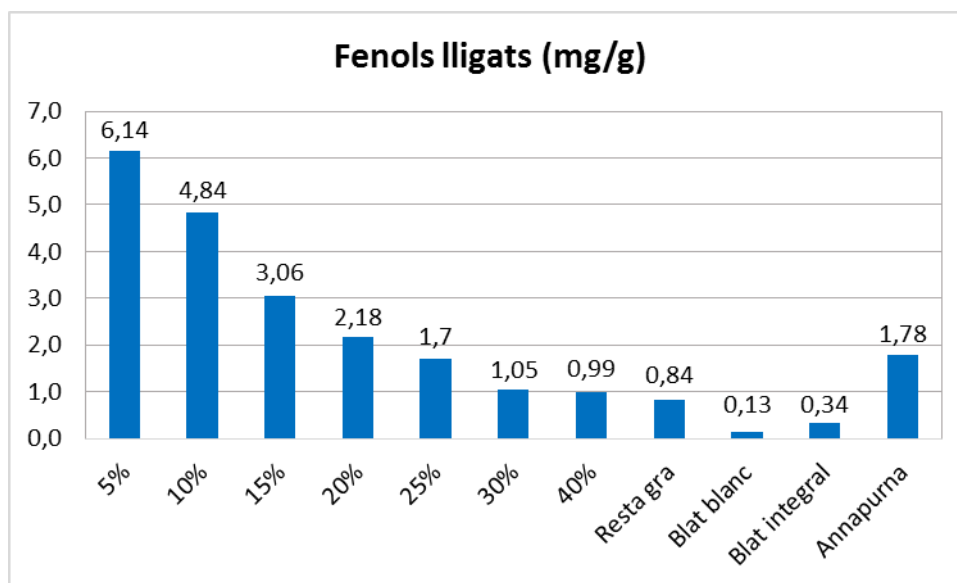
Gràfic 2.3 Contingut en fenols lliures (mg/g) de les mostres que s’indiquen.

Com podem observar en el gràfic superior, el contingut en fenols lliures de les fraccions del gra d’ordi augmenta com més externa és la fracció, de manera que les fraccions més externes com la del 5%, 10% i 15% són les que més fenols lliures contenen amb un 5,94 mg/g, 4,70 mg/g i 2,68 mg/g, respectivament. Mentre que les fraccions més internes són les que menys contingut en fenols lliures presenten, les de 20%, 25%, 30%, 40% i resta de gra amb 2,21 mg/g, 1,63 mg/g, 1,55 mg/g, 1,39 mg/g i 0,92 mg/g, respectivament.

Pel que fa a les farines de blat són les dues varietat amb menys contingut en fenols lliures amb valors que no superen els 0,4 mg/g.

D’altra banda, la farina d’Annapurna té un contingut mitjà en aquest compost bioactiu arribant a assolir un valor de 2,09 mg/g.

La taula següent presenta els resultats de la quantificació de **fenols lligats**:



Taula 2.4 Contingut en fenols lligats (mg/g) de les mostres que s’indiquen.

La quantificació dels fenols lligats de les nostres mostres no varia gaire de la de fenols lliures.

Les fraccions més externes del gra d’ordi segueixen sent les que més contingut presenten, mentre que les més internes les que menys.

Les dues varietats de blat continuen essent les dues mostres amb menys quantitat de fenols i la farina d’Annapurna no arriba a assolir els 2 mg/g en contingut en fenols lligats.

Així doncs, pel que es refereix a fenols, tant lliures com lligats, es concentren en les fraccions més externes del gra d’ordi d’Annapurna, mentre que el seu contingut en les capes més internes del gra és molt reduït.

2.2.4 Activitat antioxidant

Per determinar l’activitat antioxidant de les nostres mostres emprem el mètode ORAC-Hidrofílic.

Aquest procediment es pot aplicar a mostres sense contingut lipídic per determinar l’activitat antioxidant ORAC mitjançant l’equip FluoStar Optima.

El mètode de l’ORAC es basa en la inhibició de l’oxidació induïda pel radical peroxy que es forma per la descomposició tèrmica de compostos azo, com el 2-2’-azobis (2-amindin-propà) dihydrochloride (AAPH), sobre un substrat fluorescent (Fluoresceïna).

Aquesta inhibició es controla per la mínima pèrdua de fluorescència quan el medi se li afegeix un antioxidant.

Per expressar els resultats es compara la inhibició assolida amb la mostra amb la inhibició obtinguda amb un antioxidant de referència (Trolox).

Com bé ja s’ha explicat en la part teòrica del treball els compostos bioactius relacionats amb l’activitat antioxidant són els compostos fenòlics, per tant les mostres de les quals partirem per fer aquest anàlisi hauran estat prèviament tractades per extreure els fenols de les respectives farines. A partir d’aquí podrem observar l’activitat antioxidant que tenen aquests compostos bioactius, que basant-nos en la teoria com més compostos fenòlics conté una mostra més activitat antioxidant tindrà i a la inversa.

Els riscos identificats en aquesta analítica per a l’home són baixos, toxicitat per contacte i per ingestió, per la qual cosa només cal utilitzar els mitjans de protecció bàsics: guants, ulleres i mascareta.

Trolox: Sense riscos. Mesures de seguretat S24 I S25 (evitar contacte amb pell i ulls).

AAPH: Amb riscos tipus R22 i R43 (perill per contacte amb saliva i sensibilització de la pell) i les mesures de seguretat S24 (evitar contacte amb pell) i S37 (guants).

Per portar a terme aquest anàlisi s’han utilitzat els següents materials, reactius i equips:

Material

- Tubs de plàstic amb tap de rosca de 15 ml tipus Falcon.
- Matrassos aforats de 250 ml 500 ml i 1l.

- Micropipetes de 100 µl i 1000 µl.
- Tubs de vidre de 4 ml.
- Comptagotes.
- Vas de precipitats de 100 ml.
- Material d’ús general.

Equips

- Fluorímetre FLUOstar òptima
 - Excitació: 485 nm Emissió: 520 nm
 - Placa de 96 pous de fons negre d’un sol ús.
- Bany calefactor
- Vòrtex
- pH-metre

Reactius

- Fosfat monopotàsic anhidre (KH_2PO_4) (Fluka 60220).
- Fosfat di-sòdic, di-hidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$) (Fluka 71638).
- Trolox (Acros 218940050).
- 2-2'-azobis (2-amindin-propà) dihydrochloride (AAPH) (Acros orgànics 101560500).
- Fluoresceïna per fluorescència (Fluka 46955).

A més a més s’han de preparar les següents dissolucions:

Tampó fosfat 0.075 M (pH = 7)

Per preparar 1l de tampó es necessita:

- **Solució A:** pesar 2,27g de KH_2PO_4 en un matràs aforat de 250ml. Enrasar amb aigua MilliQ¹³.
- **Solució B:** pesar 11,87g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ en un matràs aforat de 1L. Enrasar amb aigua MilliQ.

¹³ Aigua MilliQ: aigua purificada i desionitzada.

Es barregen 200ml de la solució A + 800ml de la solució. Es comprova el pH amb el pH-metre i l’ajusta fins a 7,4. Si s’ha de pujar s’afegeix solució B, mentre que si s’ha de baixar s’afegeix solució A.

Fluoresceïna

Dissolució mare (1): dissoldre 0,0225g de fluoresceïna en 50ml de tampó fosfat. Aliquotar en tubs de 5ml, i guardar en el congelador a -44°C fins que es necessiti.

Dissolució 2: diluir 50 µl de la dissolució mare D1 en 10ml de tampó fosfat. Aliquotar en tubs de 5ml, i guardar en el congelador a -44°C fins que es necessiti.

Dissolució 3: s’ha de preparar diàriament. S’agafa 500 µl de la dissolució D2 i s’enrasa a 50 ml amb tampó fosfat.

Trolox

Dissolució mare (1): dissoldre 0,0125g de Trolox en 100ml de tampó fosfat. Aliquotar en tubs de 5ml, i guardar en el congelador a -44°C fins que es necessiti.

Es preparen el conjunt de dissolucions de Trolox només quan s’han d’utilitzar. Es preparen 6 concentracions més diluïdes de Trolox posant, 25, 50, 100, 200, 400 i 800 µl (V_{It}) de la dissolució mare en tubs graduats i s’enrasen a 4ml amb tampó fosfat. Es pot fer ús d’un comptagotes per enrasar amb més exactitud.

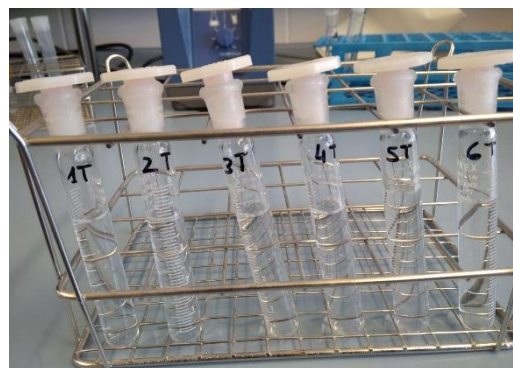


Figura 2.29 Dilucions de Trolox..

Les concentracions resultants són:

3,125 µM; 6,25 µM; 12,5 µM; 25 µM ; 50 µM i 100 µM, respectivament.

Azobis (AAPH)

La preparació i el maneig d’aquesta dissolució és crític, ja que la producció de radicals peròxid és sensible a la temperatura. S’ha de preparar una nova dissolució per a cada anàlisi.

Dissoldre 0,2g d’Azobis en 10ml de tampó fosfat pH 7,4 a 37°C, escalfant-lo en el bany.



Figura 2.30 Pesem 0,2g aprox. d’Azobis.

Preparació de les mostres

S’aprofita l’extracte de les mostres realitzat en l’apartat de la quantificació de fenols per preparar les dissolucions necessàries per realitzar l’anàlisi de l’activitat antioxidant.

Es preparen 5 dissolucions de cada mostra, posant 20, 30, 40, 60 i 80 μl (V_i) de la dissolució original de cada mostra en tubs graduats i s’enrasen a 4ml amb tampó fosfat.

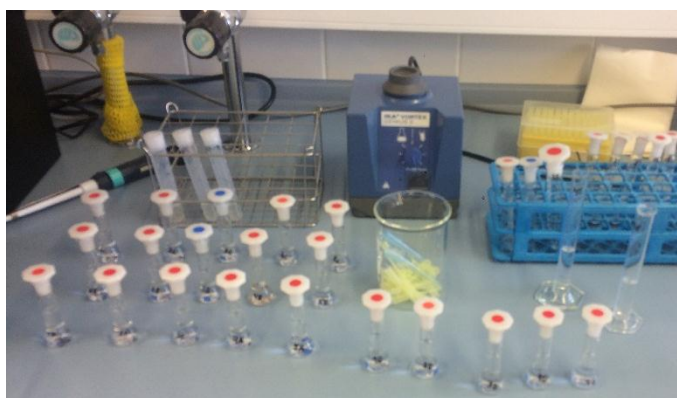


Figura 2.31 Dissolucions de diferents concentracions de cada mostra.

Les concentracions resultants són:

2,5 μM ; 3,75 μM ; 5 μM ; 7,5 μM i 18 μM respectivament.

Aquestes concentracions han estat calculades expressament per a què totes les corbes en l’ORAC caiguin i les àrees quedin dins del nostre rang. Aquets rang és determinat per la recta patró de l’antioxidant de referència , Trolox.

Procediment

- 1- Primer de tot s’encén el Fluorímetre, l’aparell gràcies al qual es realitzà l’anàlisi i on es posarà la microplaca amb les mostres, i l’ordinador que té un programa instal·lat necessari per recopilar els resultats obtinguts del Fluorímetre.



***Figura 2.32** Fluorímetre, FLUOstar òptima.*

- 2- S’obra el programa Opima-Control i es clica en la pestanya **“Prime”** per purgar els canals de l’aparell amb aigua destil·lada posant les agulles injectores dins un vas buit. A través d’aquets canals el Fluorímetre afegirà els reactius necessaris per realitzar l’anàlisi.
- 3- A través de la pestanya **“Basic parameters”**, es comprova que els paràmetres siguin:
 - N° cicles: 25
 - Temps de cicle: 500 s
 - Excitació: 485 nm Emissió: 520 nm
- 4- En una altra pestanya , **“Layout”**, es defineix la disposició de les mostres en la placa.

96	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BA	BA	BA	NA		BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA
B	BA	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	SA6	XE1	XE2	XE3	XE4	BA
C	BA	SA1	SA2	SA3	SA4	SA5	XE1	XE2	XE3	XE4	XE5	BA
D	BA	XA1	XA2	XA3	XA4	XA5	XA1	XA2	XA3	XA4	XA5	BA
E	BA	XB1	XB2	XB3	XB4	XB5	XB1	XB2	XB3	XB4	XB5	BA
F	BA	XD1	XD2	XD3	XD4	XD5	XD1	XD2	XD3	XD4	XD5	BA
G	BA	XC1	XC2	XC3	XC4	XC5	XC1	XC2	XC3	XC4	XC5	BA
H	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA	BA

Taula 2.2 Disposició de les mostres en la microplaca per l’anàlisi d’activitat antioxidant.

Per a la codificació s'utilitza:

- ✓ **B:** pels blancs, que únicament contenen tampó fosfat. La finalitat és saber la degradació de la fluoresceïna amb l’Azobis sense la presència de l’antioxidant.
- ✓ **N:** pel negatiu, que únicament conté tampó. La finalitat és comprovar que no hi ha degradació de la fluoresceïna sense l’acció de l’Azobis.
- ✓ **S:** per al Trolox, que conté les dissolucions de Trolox de 1 a 6. La finalitat és obtenir les corbes de degradació de la fluoresceïna sota l’acció de l’Azobis en presència d’un antioxidant de referència.
- ✓ **X:** per a les mostres, que contenen les dissolucions de les mostres de 1 a 5. La finalitat és obtenir les corbes de degradació de la fluoresceïna sota l’acció de l’Azobis en presència de l’antioxidant que contingui la mostra a estudi.

Per diferenciar les mostres s'utilitzen les lletres (**A, B, C...**) i per diferenciar les dissolucions, els números (**1, 2, 3...**).

La casella **5A** es deixa sense res i és la que posteriorment s'utilitzarà per fer el **“Gain”** o guany (pas **nº8**).

- 5-** En la pestanya **“Concentrations/ Volumes/ Shaking”** es comprova que en cada pou s'afegeixin les quantitats correctes de cada reactiu i que les concentracions siguin les adients. S'afegirà a tots els pous 150 µl de fluoresceïna, 25 µl d'Azobis excepte al pou **NA**, negatiu que serà zero.
- 6-** Seguidament es plena la microplaca tal i com s'indica en la plantilla anteriorment esmentada, afegint 25 µl de la solució corresponent en cada pou (mostra, tampó i Trolox). Un cop s'ha omplert s'introdueix a l'interior de l'equip (Fluorímetre).
- 7-** Es torna al menú del programa Optima i es dóna nom a l'anàlisi. Posteriorment es purguen els dos canals de l'aparell ara amb la solució corresponent: canal 1 → Fluoresceïna i canal 2 → Azobis. Es prem el botó per a que surti la microplaca i s'afegeix 180 µl de fluoresceïna en el pou **5A** que s'havia deixat en blanc. Es torna a introduir la placa dins l'equip.
- 8-** En la pestanya **“Gain Adjustment”** es marca la casella **5A** i es clica en **“ Gain adjustment (well)”**. Aquest pas és de gran rellevància ja que l'aparell ajusta els seus càlculs gràcies a aquest calibrat, en cas de no portar a terme aquest pas, s'ha de tornar a muntar la placa. Finalment es prem **“Start measurement”** començant així l'anàlisi.

Al llarg de l'anàlisi es pot visualitzar les corbes que es van originant de cada mostra. Una vegada s'acaben els 25 cicles determinats guardem els gràfics i tanquem el programa.

S'obté un arxiu Excel amb els resultats de l'anàlisi d'activitat antioxidant.

Càlculs

Observem les corbes (tant de Trolox com de mostres) que s’han obtingut i que s’han guardat en l’arxiu Excel generat per software d’Optima i descartem totes aquelles corbes que no s’hagin caigut completament.

Per l’anàlisi dels resultats obtinguts s’utilitza un full d’Excel com a plantilla. Aquest full Excel està dissenyat per calcular l’àrea sota la corba obtinguda de cada mostra. No es tenen en compte els 3 primers punts de lectura ja que en ells no s’havia addicionat l’Azobis. Al valor de l’àrea de cada mostra se l’anomena AUC (*Area Under Curve*). Seguidament es calculen les mitjanes de les AUC de les diferents repeticions, descartant aquells valors anormals.

Un cop calculades les mitjanes de AUC, es construeix una taula amb les següents dades:

Mostra	AUC	AUC*CT	NET AUC
--------	-----	--------	---------

Taula 2.3 Caselles que designen un determinat càlcul en el procés d’anàlisi dels resultats.

On:

- ✓ **Mostra:** nomenclatura de les mostres (BA, SA1,SA2,.....XD5).
- ✓ **AUC:** mitjana de les AUC (*Area Under Curve*) de cada mostra.
- ✓ **AUC*CT:** es multiplica la AUC per un factor anomenat CT (Cicle Temps), que té un valor en aquest mètode de $500/60 = 8,33333$.
- ✓ **NET AUC:** a cada valor de AUC*CT se li resta el valor de AUC*CT del blanc.

Obtenció de la recta del Trolox

Un cop calculat el NET AUC, es calcula la regressió lineal amb les dades del Trolox realitzant la següent taula:

Mostra	NET AUC	Concentració Trolox (µM)	µmols Trolox/pou
--------	---------	-----------------------------	------------------

Taula 2.4 Caselles que designen un determinat càlcul en el procés d’anàlisi dels resultats.

On:

- ✓ **Mostra:** nomenclatura de les mostres (SA1,SA2,...,SA6).
- ✓ **NET AUC:** l’hem calculada en la taula 2.3.
- ✓ **Concentració Trolox (μM) :** la que correspon, tal i com s’ha explicat amb anterioritat en l’apartat de preparació de les dissolucions (pas previ al procediment).
- ✓ **$\mu\text{mols Trolox/pou}$:** és la quantitat de mols de Trolox afegida a cada pou \rightarrow concentració de Trolox (μM)*25/10⁶.

En la regressió lineal es posa:

- En l’eix de les x’s : $\mu\text{mols Trolox/pou}$
- En l’eix de les y’s : NET AUC

S’obté un gràfic i l’equació de la recta :

$$y_T = a_T \cdot x_T + b_T$$

Obtenció de la recta de les mostres

Per a cada mostra es realitza una taula de característiques similars, amb els següents apartats (taula 2.5) descartant aquells valors en els que NET AUC estiguin fora de l’interval definit pel Trolox.

Mostra	NET AUC	Concentració mostra	$\mu\text{mols d’extracte en}$ pou
--------	---------	------------------------	---------------------------------------

Taula 2.5 Caselles que designen un determinat càlcul en el procés d’anàlisi dels resultats.

On:

- ✓ **Mostra:** nomenclatura de les mostres (SA1,SA2,...,SA6).
- ✓ **NET AUC:** l’hem calculada en la taula [2.3](#).
- ✓ **Concentració de mostra:** introduir els valors calculats de concentració de la mostra en mg/μmols en cada pou, ja calculada amb anterioritat en l’apartat de preparació de les mostres (pas previ al procediment).
- ✓ **μmols d’extracte:** és la concentració de la mostra * 0,025 ml afegits en cada pou.

Segons la naturalesa de la mostra el valor de concentració pot estar expressat en altres untats.

En la regressió lineal es posa:

- En l’eix de les x’s : μl d’extracte/pou.
- En l’eix de les y’s : NET AUC.

S’obté un gràfic i l’equació de la recta :

$$y_M = a_M \cdot x_M + b_M$$

Càlcul de l’activitat antioxidant de la mostra

Per realitzar els càlculs s’ha d’igualar els valors “y” de les dues rectes:

$$y_T = y_M$$

$$a_T \cdot x_T + b_T = a_M \cdot x_M + b_M$$

Per trobar els μmols Trolox equivalents per cada μl d’extracte, suposem el valor $x_M = 1$ mg d’extracte , obtenint el sistema d’equacions:

$$a_T \cdot x_T + b_T = a_M \cdot 1 + b_M$$

$$a_T \cdot x_T = a_M + b_M - b_T$$

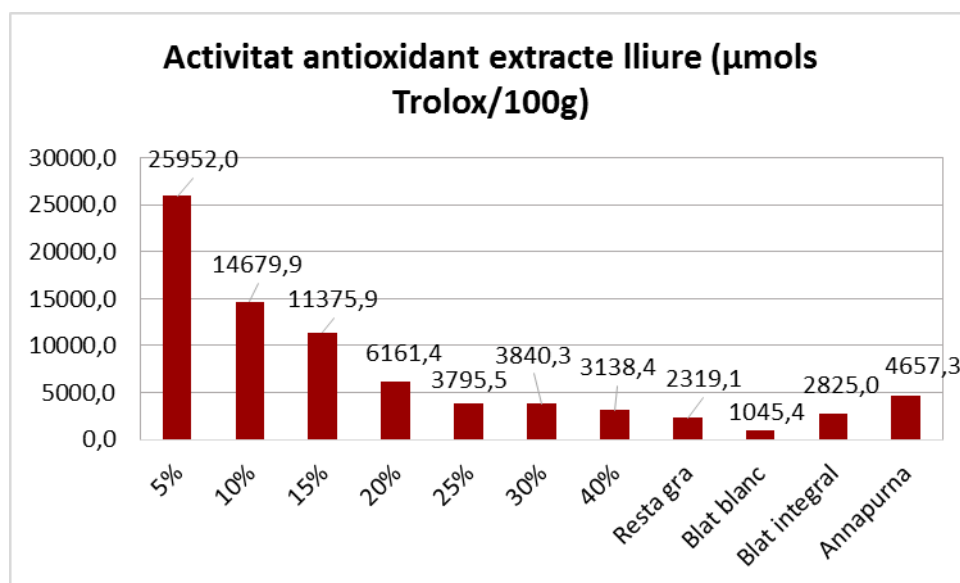


$$x_T = (a_M + b_M - b_T) / a_T$$

Resultats

Després de realitzar els càlculs corresponents, obtenim els següents resultats:

Activitat antioxidant **fenols lliures**



Gràfic 2.5 Resultats obtinguts de l’anàlisi de l’activitat antioxidant (AOX) de compostos fenòlics de tipus lliure.

Com podem observar en la gràfica de resultats, l’activitat antioxidant màxima correspon a farines relatives a les capes més externes del gra d’ordi, amb valors de 25952, 14679,9 i 11375,9 µmols Trolox/100 g corresponent a les mostres de 5%, 10% i 25% respectivament.

Per altra banda, a partir del la mostra del 20% apreciem com la capacitat antioxidant es redueix aproximadament a la meitat assolint els 6161,4 µmols Trolox/100 g. Pel que fa a les mostres del 25%, 30% i 40% la seva capacitat antioxidant no supera els 4000 µmols Trolox/100 g i disminueix a mesura que ens endinsem en el gra d’ordi.

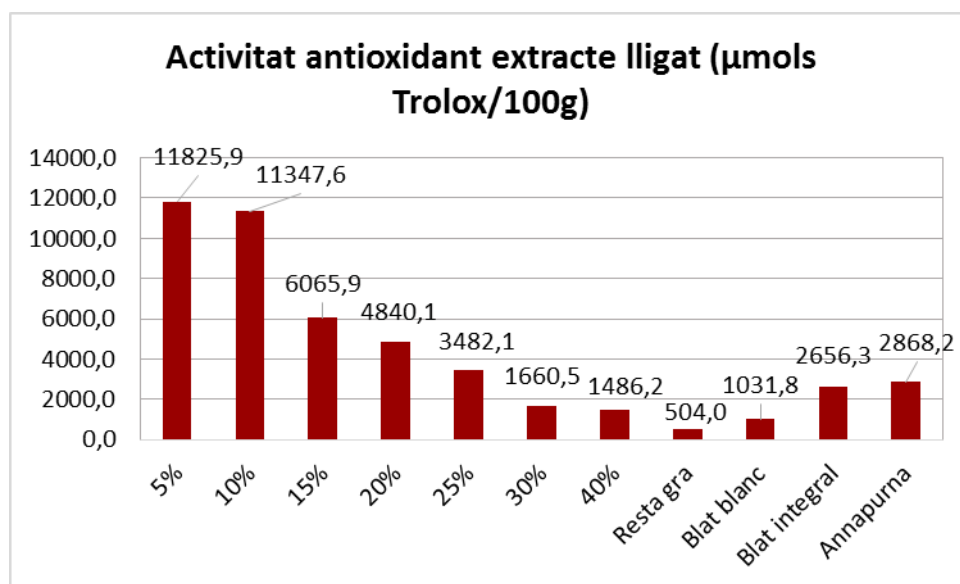
Aquests resultats els podem comparar amb els obtinguts en l’anàlisi de la quantificació de fenols de les mostres. Es coneix que els compostos fenòlics són els que tenen capacitat antioxidant, i així ho hem pogut observar, ja que les farines corresponents a les capes més externes del gra d’ordi de les quals vam obtenir un alt contingut en compostos fenòlics, són les mateixes fraccions que presenten una elevada activitat antioxidant, mentre que les

farines corresponents a les fraccions més internes del gra d’ordi que contenen menys compostos fenòlics són les que menys capacitat antioxidant presenten.

De la mostra d’*Annapurna* obtenim que la seva capacitat antioxidant és de 4657,3 $\mu\text{mols Trolox}/100\text{ g}$ valor molt inferior comparat amb el de les fraccions més externes però superior al de les fraccions més internes, ja que és una mescla homogènia de totes aquestes fraccions.

Per últim, les dues mostres de blat tenen valors mínims en comparació amb la resta, no obstant, però el blat integral presenta el doble d’activitat que el blat blanc, a causa del seu contingut en cobertes de gra.

Activitat antioxidant de **fenols lligats**



Gràfic 2.6 Resultats obtinguts de l’anàlisi de l’activitat antioxidant (AOX) de compostos fenòlics de tipus lligat.

Els resultats d’aquesta segona part de l’anàlisi no varien gaire de la de fenols lliures en quan a resultat general de l’activitat antioxidant de cada mostra, tot i que si difereixen en quan a valors obtinguts. En general l’activitat antioxidant resultant de l’acció dels compostos fenòlics de tipus lligat és inferior a la de tipus lliure.

Les mostres corresponents a les fraccions més externes segueixen sent les que més capacitat antioxidant presenten amb valors de 11825,9 , 11347,6 i 6065,9 $\mu\text{mols Trolox}/100\text{ g}$ de les mostres de 5%, 10% i 15%, respectivament.

A mesura que ens anem endinsant en el gra d’ordi la capacitat antioxidant va disminuint assolint els 504 $\mu\text{mols Trolox}/100\text{ g}$ de la mostra de la resta de gra.

La farina d’*Annapurna* presenta una capacitat antioxidant equivalent als 2868,2 $\mu\text{mols Trolox}/100\text{ g}$ valor superior comparat amb les fraccions més internes del gra d’ordi, però inferior al de les farines de les fraccions externes.

Per últim, les dues varietats de blat, són les que presenten valors mínims de capacitat antioxidant, tot i que el valor obtingut del blat integral és molt proper al de la farina d’*Annapurna*.

En conclusió, a partir d’aquests resultats podem afirmar que les fraccions més externes del gra d’ordi d’Annapurna són les que més activitat antioxidant presenten, mentre que les més internes les que menys. Així doncs, és evident que per elaborar una galeta amb activitat antioxidant se seleccionaran les fraccions més externes del gra d’ordi d’Annapurna.

2.3 Elaboració de galetes enriquides en compostos bioactius

Prèviament hem esmentat els resultats obtinguts de les diferents analítiques realitzades a les nostres mostres, en les que s’ha quantificat els β -glucans, arabinoxilans, fenols i activitat antioxidant. A partir d’aquests resultats ens disposem a triar les fraccions amb les que elaborarem les galetes enriquides en els compostos bioactius a estudi.

2.3.1 Tria de fraccions

A partir dels resultats obtinguts hem pogut observar que les mostres corresponents a les fraccions més externes del gra d’ordi són les més enriquides en arabinoxilans, fenols i conseqüentment en activitat antioxidant. Concretament aquestes fraccions externes són les del 5% , 10% i 15%. Per tant, seria de gran interès elaborar una galeta enriquida en aquests compostos bioactius a partir d’aquestes fraccions.

D’altra banda, les fraccions de 20%, 25%, 30%, 40% i resta gra són les que més contingut en β -glucans presenten i això fa que siguin les idònies per a elaborar un altre tipus de galeta enriquida en aquest compost bioactiu.

A més a més, elaborarem dues varietats de galetes més com a control. Una galeta de farina d’*Annapurna* (gra sencer) i una altra de farina de blat convencional. Aquestes dues varietats ens serviran per fer una comparació amb les galetes principals enriquides en compostos bioactius.

Per elaborar les galetes a partir de les fraccions triades, només s’emprarà un 30% de fracció d’ordi i el 70% restant de blat blanc. El motiu es deu al baix contingut de gluten de l’ordi, proteïnes responsables d’una millor textura, d’un augment en la retenció d’aigua i de que l’aliment romangui més temps tou. Per tant, un 30% de farina d’ordi serà idoni, per establir un equilibri entre esponjositat i riquesa en compostos bioactius. D’altra banda, vam decidir utilitzar farina de blat blanc perquè el contingut en compostos bioactius és molt similar al del blat integral, però té millor acceptació.

Pel que fa a les galetes d’ordi d’*Annapurna* i la de blat blanc, s’utilitza 100% farina de cada tipus a diferència de les altres dues varietats de galetes.

2.3.2 Elaboració de galetes

Partint amb la base que elaborarem quatre tipus de galetes diferents, amb la composició resumida en la taula 2.6.

<i>Galeta</i>	<i>% Blat</i>	<i>% Ordi</i>	<i>Fracció d’ordi</i>
A	70	30	Externa 0-15%
B	70	30	Interna 20-100%
C	0	100	0-100%
T	100	0	0

***Taula 2.6** Taula resum dels diferents tipus de galeta.*

A continuació, explicarem el protocol triat per elaborar les galetes, els ingredients , els aparells i eines utilitzats i el procés d’elaboració:

Mètode oficial : Baking Quality of Cookie Flour

El mètode que ha estat triat per elaborar les galetes és un mètode oficial que dóna prioritat a les mesures de les galetes, aquest mètode (AACC International Method 10-50.05), determina que la qualitat de les galetes resultants radica en les seves mides. La recepta que detalla és per a 225 g de farina, però nosaltres l’hem adaptat a la meitat de la quantitat, així doncs la recepta està modificada per a 112,5 g de farina totals.

Les mides de les galetes resultants són de 60 mm de diàmetre i 6 mm de grossor.

Ingredients

- 112,5 g de farina total :
 - Galeta **A** : 33,75 g de farina d’ordi de les fraccions de 5%, 10% i 15% i 78,75 g de farina de blat blanc.
 - Galeta **B** : 33,75 g de farina d’ordi de les fraccions de 20%, 25% i 30%, 40% i resta de gra i 78,75 g de farina de blat blanc.

- Galeta **C**: 112,5 g de farina d’ordi *Annapurna*
- Galeta **D**: 112,5 g de farina de blat blanc.
- 32 g de Margarina (greix vegetal).
- 65 g de sucre.
- 1,05 g de sal (NaCl, U.S. Pharmacopeia (USP)).
- 1,25 g de Bicarbonat de sodi (NaHCO₃).
- 16,5 ml de solució de Dextrosa (8.9 g de dextrosa hydrous, USP en 150 ml d’aigua).
- 8 ml d’aigua destil·lada.

Aparells i eines

- Bàscula.
- Tubs de Falcon de 15 ml i 50 ml.
- Bols d’alumini.
- Batidor manual.
- Paper de cuina.
- Corró de 6 mm de grossor.
- Motlles de galetes de 60 mm de diàmetre.
- Forn.
- Refrigerador.

Procediment

- 1-** Primer de tot, es mesuren les quantitats de tots els ingredients que es necessiten. S’utilitza una bàscula de precisió per pesar els sòlids i tubs de falcon amb marcadors de volum pels líquids. Pel que fa a les farines de les fraccions es barregen bé, posant-les en un recipient i agitant-les, obtenint així una farina final homogènia.



Figura 2.33 Quatre bols per a quatre masses.

- 2- En cada bol primer es mesclen els sòlids: la margarina, el sucre, la sal i el bicarbonat de sodi, durant 2 min. Seguidament s’afegeix la farina corresponent a cada bol, per la Galeta **A**: **mescla farina A** (33,75 g de farina d’ordi de les fraccions externes fins al 15% i 78,75 g de farina de blat blanc); Galeta **B**: **mescla farina B** (33,75 g de farina d’ordi de les fraccions internes de 20-100% i 78,75 g de farina de blat blanc); Galeta **C**: 112,5 g de farina d’ordi *Annapurna* ; i Galeta **T**: 112,5 g de farina de blat blanc, i es segueix barrejant 2 min més .
- 3- Es fa ús del batidor manual i se segueix barrejant la massa, s’afegeix la dextrosa, que s’utilitza per ajudar a desenvolupar el color marró de les galetes, i l’aigua. Per la massa de la galeta C hem afegit 10 ml més d’aigua perquè hem observat que la massa era molt rígida.
- 4- Quan ja s’obté una massa homogènia i mal·leable, es fa un cilindre i es talla la massa de cada galeta en quatre porcions. Cada porció se li dóna la forma d’una esfera i es guarden al refrigerador, mentre es manipulen les altres masses.
- 5- De cada tipus de galeta s’obtenen quatre boles, de les quals resultaran dues galetes cadascuna. Es comencem amb una bola de la massa de la galeta A, i amb el corró s’aplana la massa fins aconseguir uns 6mm de grossor, i seguidament amb el motlle de 60mm de diàmetre es talla la forma de la galeta. I així successivament amb la resta de masses de les altres varietats de galetes.



Figura 2.34 Amassem amb el corró.

Es mantenen les masses en el refrigerador sempre que no s’estiguin manipulant. El procés es porta a terme a sobre del paper de cuina; un cop preparada la galeta per la cocció s’evitarà qualsevol contacte per no alterar les mesures; qualsevol moviment es farà mitjançant el paper de cuina.

- 6- Per cuinar les galetes s’organitzen en les safates de la manera següent:

<table><tr><td>A</td><td>A</td></tr><tr><td>B</td><td>B</td></tr><tr><td>C</td><td>C</td></tr><tr><td>T</td><td>T</td></tr></table>	A	A	B	B	C	C	T	T	<table><tr><td>T</td><td>T</td></tr><tr><td>A</td><td>A</td></tr><tr><td>B</td><td>B</td></tr><tr><td>C</td><td>C</td></tr></table>	T	T	A	A	B	B	C	C	<table><tr><td>C</td><td>C</td></tr><tr><td>T</td><td>T</td></tr><tr><td>A</td><td>A</td></tr><tr><td>B</td><td>B</td></tr></table>	C	C	T	T	A	A	B	B	<table><tr><td>B</td><td>B</td></tr><tr><td>C</td><td>C</td></tr><tr><td>T</td><td>T</td></tr><tr><td>A</td><td>A</td></tr></table>	B	B	C	C	T	T	A	A
A	A																																		
B	B																																		
C	C																																		
T	T																																		
T	T																																		
A	A																																		
B	B																																		
C	C																																		
C	C																																		
T	T																																		
A	A																																		
B	B																																		
B	B																																		
C	C																																		
T	T																																		
A	A																																		
1	2	3	4																																

Taula 2.7 Organització de les safates en les que dipositem les galetes per cuinar-les al forn. Cada lletra designa un tipus de galeta. **A:** Galeta A, **B:** Galeta B, **C:** Galeta C i **T:** Galeta T.

Tal i com es pot observar de cada tipus de galeta s’obtenen 8 galetes, les quals no es posen totes en la mateixa safata. Es distribueixen les galetes d’aquesta manera perquè si algun factor s’altera afectarà a totes de la mateixa manera, ja que canviem la seva distribució en cada safata.

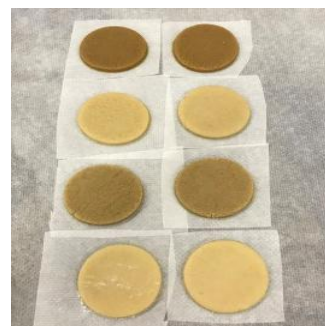


Figura 2.35 Exemple de la distribució de les galetes.

- 7- Es pre-escalfa el forn a 205° C i s’introdueix la primera safata. Es deixen les galetes 10 min en el forn i després es procedeix a retirar-les.

“S’observa que les galetes surten una mica dorades i es decideix reduir la temperatura un parell de graus”.



Figura 2.36 Forn pre-escalfat a 205°C.

No s'utilitza la mateixa safata, ja que la que s'utilitza assoleix elevades temperatures, per això es va alternant, perquè tornin a assolir temperatures normals, per poder-les tornar a utilitzar.

- 8- Finalment, es deixen refredar les galetes i es guarden agrupant-les segons la varietat que siguin i s'etiqueten.



Figura 2.37 Galetes resultants.

2.4 Anàlisis de compostos bioactius: Galetes

Per observar com ha afectat el procés de preparació a les galetes, es procedeix a fer una comparativa visual i els mateixos anàlisis de compostos bioactius que hem realitzat a les farines d’ordi.

A la figura 2.38 s’aprecia que totes les galetes van tenir una forma i color correcte tot i que s’aprecien petites diferències:

Primerament s’observa que el pes mitjà de totes les galetes és de 20 g aprox., però es detecta una variació en el color i el volum.

Les galetes A i C tenen un color més fosc ja que han estat cuinades amb fraccions de la coberta o amb la farina de tot el gra, respectivament. La galeta B, cuinada a partir de les fraccions més internes del gra presenta un color més clar, semblant a la de blat perquè

hem eliminat les cobertes i a més a més també perquè són fraccions abundants en midó i β -glucans.

En referència al volum, tot i que no s’ha mesurat, es pot apreciar que quan s’introdueix farina d’ordi, la mescla disminueix de mida. Les més voluminoses són les galetes T (galeta de la part dreta de la figura 2.38), cuinades a partir d’un 100% farina de blat, ja que contenen gluten, i les que menys les galetes C (tercera galeta per l’esquerra de la figura 2.38), cuinades a partir de 100% farina integral d’ordi.



Figura 2.38 Comparació galetes resultants i les fraccions de farina corresponents (galetes A, B, C i T, de esquerra a dreta).

Posteriorment, es molen les galetes en un molí tipus *Molinex*. D’aquesta manera s’obtenen mostres amb les que es poden fer els anàlisis. A més a més s’analtitzaran mostres de la farina **A** i farina **B** que s’han utilitzat per fer les galetes tipus **A** i **B**, respectivament. De la farina d’ordi d’*Annapurna* i farina de blat, no s’ha de fer els anàlisis ja que han estat realitzats amb anterioritat.

Humitat relativa

De la mateixa manera que hem calculat la humitat relativa de les mostres de farina calculem la de les mostres de les galetes. Es pesen 500 mg de cada mostra i es posen en l’estufa a 80° C durant 24 h. Els càlculs que es porten a terme són els ja esmentats en la part prèvia als anàlisis de les farines.

2.4.1 Quantificació β -glucans

En aquesta analítica les mostres de les galetes són sotmeses a un previ tractament amb etanol per eliminar el màxim de greix (Margarina), perquè els enzims puguin actuar i els resultats no es vegin alterats.

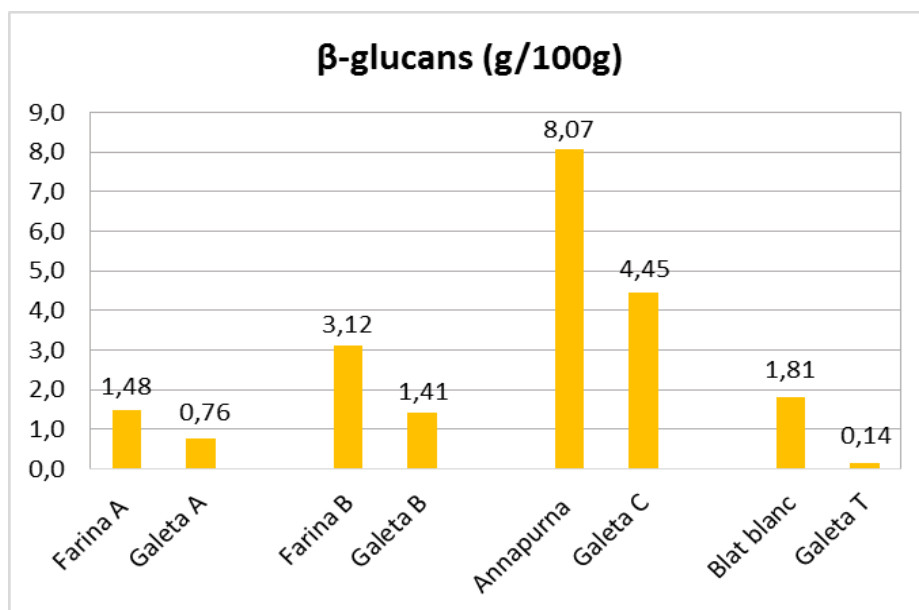
Aquest tractament previ es porta a terme amb les mostres de les galetes A, B, C i T i és el següent:

- 1-** S’afeixen 5 ml d’etanol a cada mostra i es dona un punt de vòrtex perquè s’acabi de barrejar amb tota la mostra. Posteriorment, es deixen els tubs Falcon 15 ml en un bany a 100°C durant 5 min.
- 2-** Tot seguit, es centrifuguen les mostres a 3000 rpm 10 min. Es descarta el sobrenedant de les mostres, on es troba el greix i la resta de residus, i es conserva el pellet .
- 3-** Es torna a afegir 5 ml d’etanol i es repeteix el mateix procediment.

A partir d’aquí es continua amb el protocol d’extracció de β -glucans, explicat amb detall amb anterioritat en l’anàlisi de les mostres de farina d’ordi.

Resultats

El gràfic següent conté els resultats obtinguts de l’anàlisi de les mostres indicades:



Gràfic 2.7 Resultats obtinguts de l’anàlisi de β -glucans de les mostres indicades.

El primer que observem és que el contingut de β -glucans a les galetes és menor que el de les farines. Això és normal ja que la massa per elaborar les galetes conté un 48% de farina i el 52% d’altres ingredients (margarina, sucre, etc). A més a més, si durant la cocció es perden la major part d’ingredients líquids de la massa (solució de dextrosa i aigua) la proporció de farina en la galeta passarà a ser el 53%. Per tant és esperable trobar una reducció del 53% en el pas de massa a galeta en el contingut de qualsevol compost bioactiu. Una disminució major es pot atribuir a l’efecte de la temperatura durant l’elaboració de les galetes, però aquest efecte és molt poc apreciable ja que el temps de cocció ha estat molt curt (10 minuts). En general aquesta reducció afecta de manera semblant a tots el tipus de galetes.

Com es veu reflectit en els resultats del gràfic 2.7, la galeta C va al capdavant amb major contingut en β -glucans, amb 4,45 g/100 g. No obstant, aquesta galeta no és la millor opció per elaborar un aliment funcional, ja que com hem comentat amb anterioritat està cuinada a partir de farina 100% d’ordi. Aquesta farina resulta en una massa rígida que cuinada desemboca en un aliment bastant dur, poc idoni pel consum humà a causa de l’absència de gluten en l’ordi.

La galeta B cuinada a partir de la farina de les capes més internes del gra l’ordi, és la segona amb més contingut en β -glucans amb uns 1,4 g/100 g, deu vegades més que la galeta T de blat blanc . A continuació, segueix la galeta A amb 0,8 g/100 g i finalment la galeta T amb 0,14g/100 g.

Si el pes d’una galeta es 20 g i cada galeta B conté un 1,4% de β -glucans, amb una ració de 3 galetes se supera els 0,75 g de β -glucans establerts per la EFSA (<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2471>) per tenir l’al·legació nutricional.

Així doncs, la galeta B, elaborada a partir de 30% de farina d’ordi del “20% 30%, 40% i resta de gra” d’ordi i un 70% farina de blat blanc, es presenta com la millor alternativa per dissenyar un aliment enriquit en β -glucans, oferint un equilibri entre un alt contingut d’aquet compost i l’esponjositat habitual d’una galeta convencional.

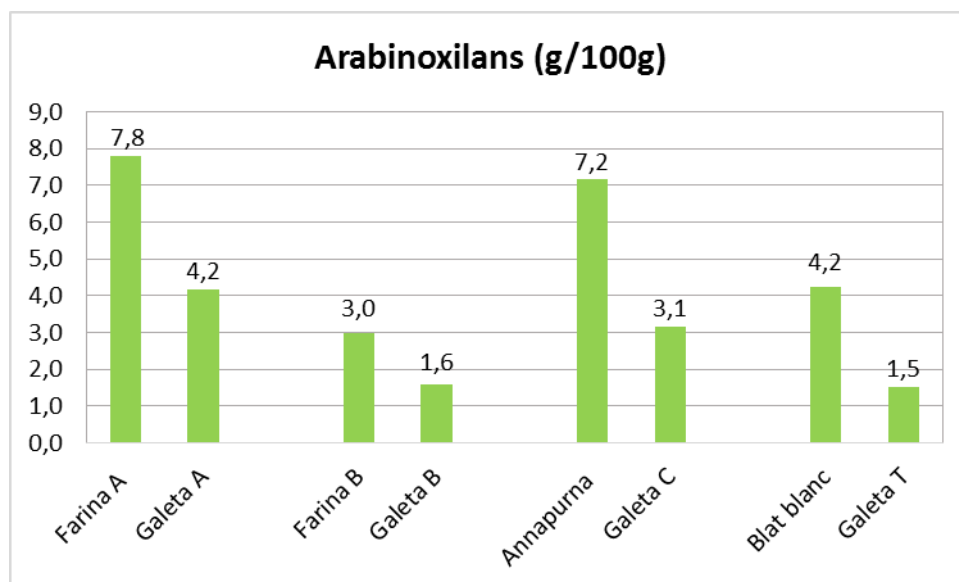
2.4.2 Quantificació d’Arabinxilans

Es porta a terme el mateix procés d’anàlisi, com si es tractessin de mostres de farina. L’excepció és que les mostres dels quatre tipus de galetes se’ls hi fa un tractament previ, que consisteix en posar-les en l’estufa a 40° C durant 12 h.

Aquest pas no substitueix el procediment que es porta a terme per calcular la humitat relativa. L’objectiu d’aquest pas previ és assegurar-nos que la mostra està en les condicions adequades per fer els respectius anàlisis.

Resultats

El gràfic següent conté els resultats obtinguts de l’anàlisi de les mostres indicades:



Gràfic 2.8 Resultats obtinguts de l’anàlisi d’Arabinxilans de les mostres indicades.

La galeta A presenta més quantitat d’arabinxilans en comparació amb la resta.

El segon tipus de galeta que presenta més quantitat d’arabinxilans és la galeta C. Aquest tipus de galeta cuinada a partir d’un 100% de farina d’Annapurna.

Observem que la galeta de blat convencional conté un 1,5% de arabinxilans i utilitzant les cobertes externes del gra de l’ordi s’incrementa el contingut fins al 7,8% de la galeta A.

Per tant, gràcies a la concentració de la farina de les capes més externes del gra aconseguim incrementar gairebé 3 vegades el contingut d’arabinoxilans de la galeta de blat, tot i la disminució produïda en el pas de massa a galeta, com ja hem comentat amb anterioritat.

És evident doncs, que la galeta A és millor alternativa que les galetes de blat, i que les galetes d’ordi, ja que presenta l’equilibri adequat entre el contingut en el compost bioactiu desitjant, en aquest cas arabinoxilans, i la idoneïtat pel consum humà.

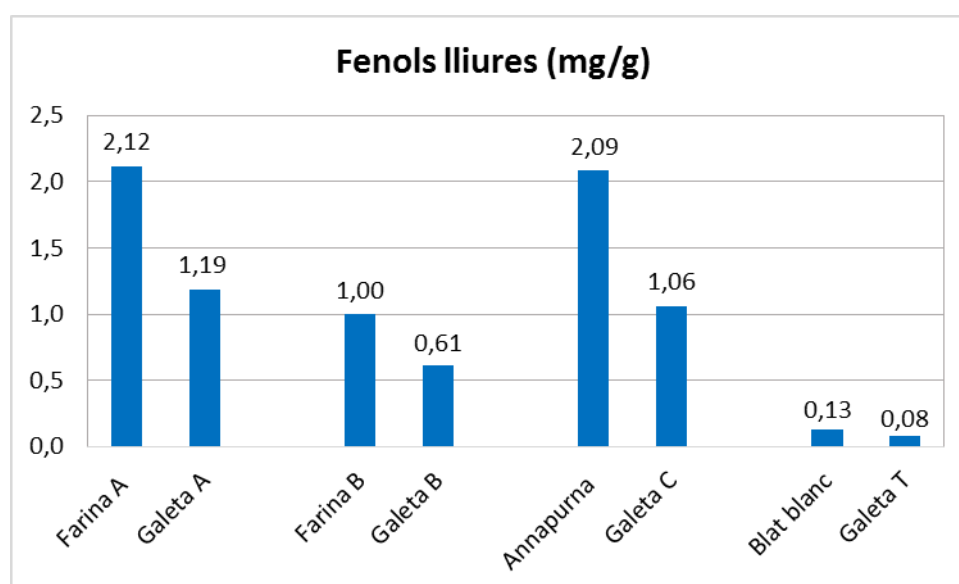
2.4.3 Quantificació de fenols

El procés d’anàlisi és el mateix que el portat a terme amb les mostres de farina d’ordi, a excepció del tractament previ realitzat a les mostres de les galetes, que consisteix en posar-les a l’estufa a 40°C durant 12 h.

Resultats

Els gràfics següents contenen els resultats obtinguts de l’anàlisi de les mostres indicades:

Fenols lliures



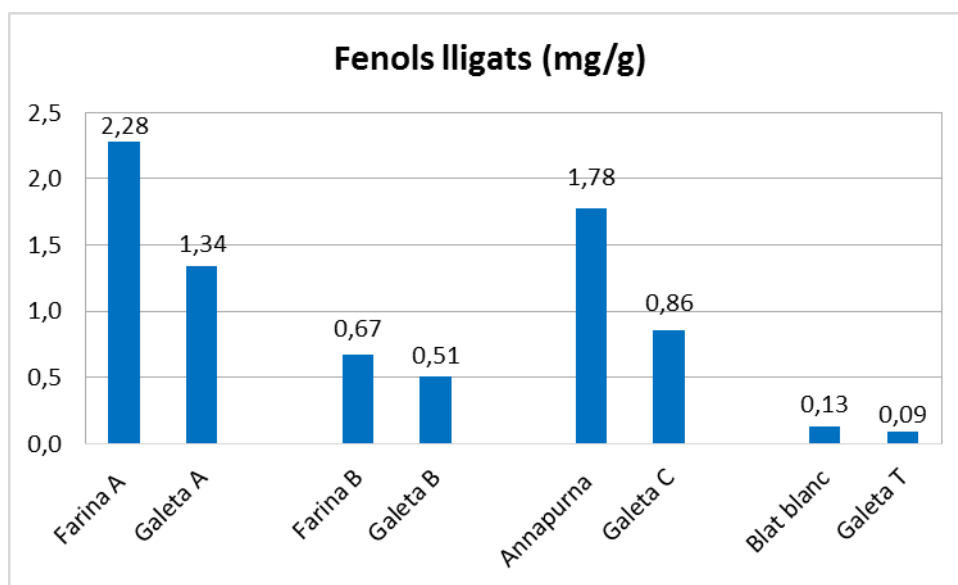
Gràfic 2.9 Resultats obtinguts de l’anàlisi de fenols lliures de les mostres indicades.

Com podem observar en la taula, la galeta A és la que més quantitat de fenols lliures presenta, tot i que en procés de pas de massa a galeta el contingut s’ha vist força reduït¹⁴.

Seguidament la galeta C és la que presenta més quantitat de fenols lliures en comparació amb les altres varietats de galeta, amb 1,06 mg/g , valor molt pròxim al de la galeta A que conté, 1,19 mg/g.

Tot i que sembla que no hi gran variació, la galeta A segueix sent una millor alternativa a la galeta C, ja que és més apta pel consum, gràcies a la barreja de la farina de les capes més externes del gra d’ordi (30%) amb farina de blat (70%).

Fenols lligats



Gràfic 2.10 Resultats obtinguts de l’anàlisi de fenols lligats de les mostres indicades.

En aquest cas, la galeta A segueix estant al capdavant, presentant 1,34 mg de fenols lligats/ g, a diferència dels resultats de l’anàlisi de fenols lliures, en aquest cas la galeta A manté més diferència amb la galeta C, que presenta 0,86 mg de fenols lligats /g, una diferència de 0,5 mg/g aprox.

¹⁴ La causa de la disminució del contingut dels compostos actius del pas de massa a galeta, ha estat explicat amb anterioritat en l’apartat de **resultats** de l’anàlisi de **β-glucans** de les galetes .

La disminució del contingut en fenols després del procés de preparació, segueix sent força notable i afectant en general a tots els tipus de galeta d’una manera bastant semblant.

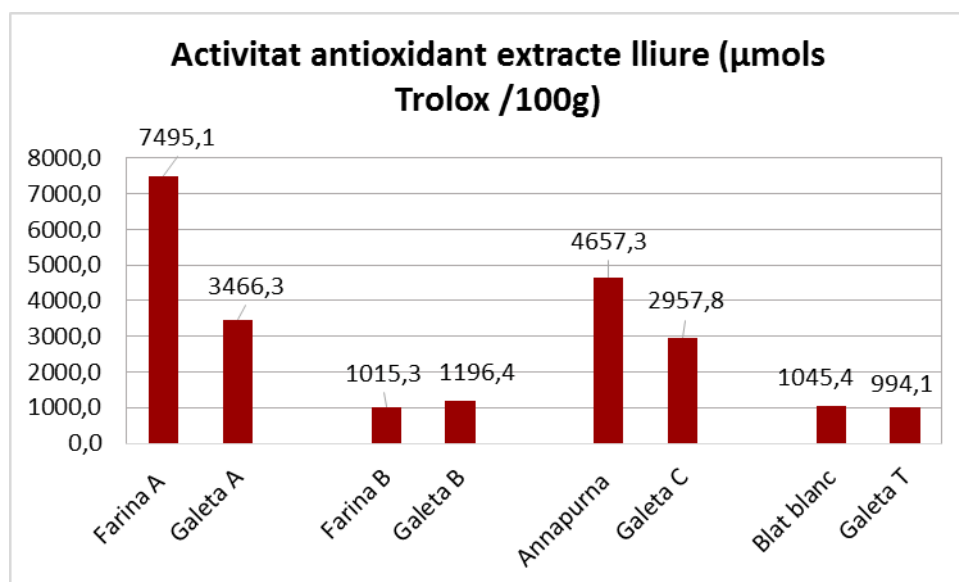
2.4.4 Activitat antioxidant

El procés d’anàlisi és el mateix que el portat a terme amb les mostres de farina de l’ordi, a excepció del tractament previ realitzat a les mostres de les galetes, que consisteix en posar-les a l’estufa a 40°C durant 12 h.

Resultats

Les taules següents contenen els resultats obtinguts en l’anàlisi de les mostres indicades:

Fenols lliures



Gràfic 2.11 Resultats obtinguts de l’anàlisi d’activitat antioxidant (AOX) de fenols lliures de les mostres indicades.

L’activitat antioxidant com ja hem vist amb anterioritat es deu sobretot a l’alt contingut de fenols que conté la mostra que s’analitza, per tant s’espera que aquelles mostres que en els anàlisis de fenols destaquin pel seu alt contingut en aquest compost també siguin les que presentin més activitat antioxidant.

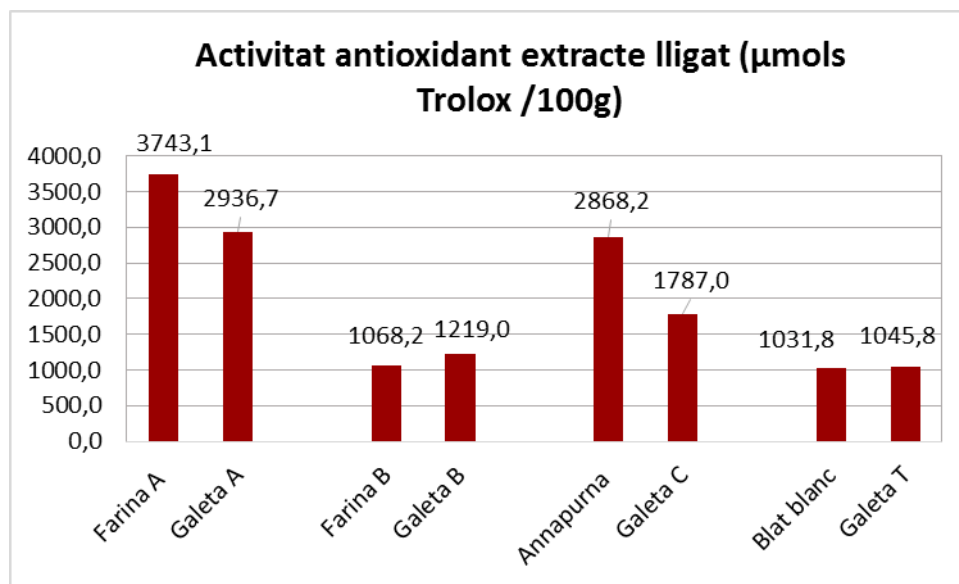
La galeta A que destacava pel seu alt contingut en fenols i arabinoxilans és també la que presenta més activitat antioxidant, tot i la reducció produïda després de la elaboració de

la massa i del procés de cocció. La reducció ha suposat la disminució de l’activitat antioxidant a la meitat de 7495 AOX extracte $\mu\text{mols Trolox /100 g}$ que presentava la farina A a 3466 AOX extracte $\mu\text{mols Trolox /100 g}$ que acaba tenint la mostra de galeta A cuinada.

A continuació, trobem la galeta C que també destaca per la seva alta activitat antioxidant amb 2958 AOX extracte $\mu\text{mols Trolox /100 g}$, però que també s’ha vist afectada per la reducció que suposa el procés d’elaboració com la resta de tipus de galeta.

El tipus de galeta B i T són les que menys activitat antioxidant presenten amb 1196 i 994 AOX extracte $\mu\text{mols Trolox /100 g}$, respectivament. Sabem que això es deu al baix contingut en fenols i arabinosilans, compostos clau en l’activitat antioxidant. A més a més en aquets tipus de galetes s’observa una activitat antioxidant similar o fins i tot superior (galeta B), a la de les farines malgrat l’efecte dilució de la massa. Això ja s’ha descrit en altres estudis i pot ser degut a que de vegades el tractament tèrmic fa que s’alliberin certs compostos com ara melanoïdines¹⁵ que tenen activitat antioxidant. En el nostre cas aquest efecte només s’aprecia en les galetes de tipus B i les de blat.

Fenols lligats



Gràfic 2.12 Resultats obtinguts de l’anàlisi d’activitat antioxidant (AOX) de fenols lligats de les mostres indicades.

¹⁵ Melanoïdines: molècules que es generen en reaccionar una molècula de hidrat de carboni i un aminoàcid en determinats aliments a temperatures elevades.

En el cas de les galetes B s'observa un lleuger increment de l'activitat antioxidant, com en el cas de l'activitat antioxidant de l'extracte lliure, en les galetes T es manté. Com s'ha comentat anteriorment aquest fenomen pot ser degut a la formació de compostos antioxidants com a resultat del procés de cocció que depèn en gran mesura de la composició de cada massa.

La galeta A destaca també per l'activitat antioxidant produïda pel seu alt contingut en fenols lligats, que juntament amb l'activitat antioxidant dels fenols lliures la converteix en el tipus de galeta idoni per l'acció antioxidant.

Amb 2937 AOX extracte μ ols Trolox /100g la galeta A se sobreposa a la galeta C, de 1787 AOX extracte μ ols Trolox /100 g , presentant així una millor alternativa a la galeta T, galeta de blat convencional i posicionant-se d'aquesta manera com un tipus d'aliment funcional viable pel consum humà.

3. Conclusions

El treball de recerca presentat tracta sobre el primer cereal domesticat per l’home, l’ordi, l’interès del qual ha anat augmentant darrerament per les seves múltiples aplicacions sobretot en el camp de l’alimentació humana.

Al principi plantejàvem la idea de poder elaborar un aliment funcional que fos ric en un compost bioactiu.

La hipòtesi era que utilitzant fraccions del gra d’ordi podíem arribar a augmentar la concentració d’un determinat compost, i posteriorment poder utilitzar aquesta farina per elaborar galetes.

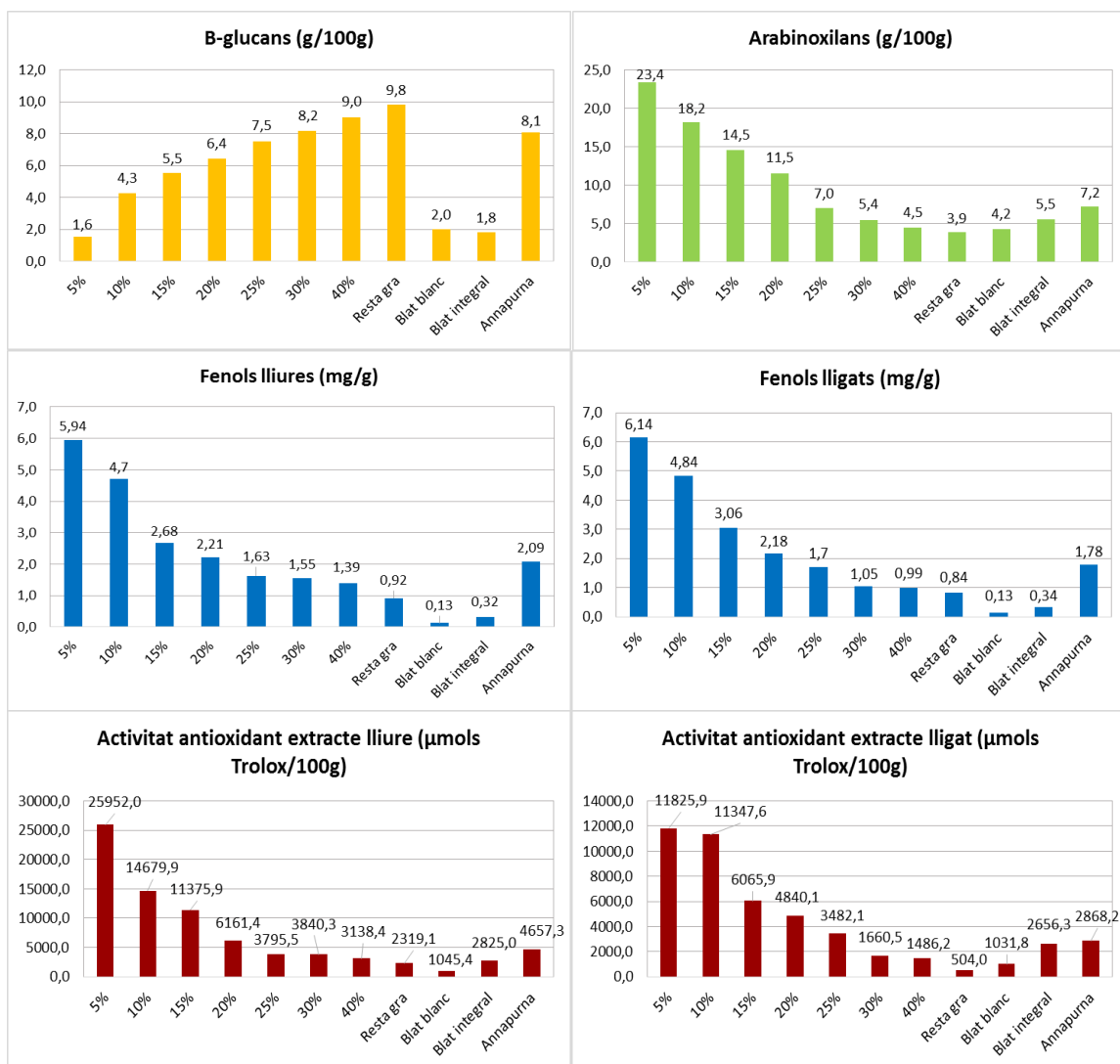
A tall de recapitulació, em dispenso a fer un recull general de totes les conclusions:

Primer de tot, tal i com ja plantejàvem en la introducció els compostos bioactius de l’*Annapurna* no estan distribuïts homogèniament pel gra, sinó que es concentren en determinades capes. Això ens ha permès perlar el gra d’ordi i obtenir fraccions enriquides en aquets compostos de manera selectiva.



Figura 3.1 Farines corresponents a les fraccions del gra d’ordi.

De les fraccions obtingudes s’aprecia que les més externes presenten un color marró més fosc, i que a mesura que aprofundim en el gra el color tendeix a ser més blanquinós.



Gràfic 3.1 Recull dels resultats de tots els anàlisis de les farines.

Seguidament, gràcies als anàlisis portats a terme (**Gràfic 3.1**) hem pogut observar que en les fraccions més externes abunden els arabinxilans i els fenols, i conseqüentment l’activitat antioxidant i que a mesura que ens endinsàvem dins del gra aquest contingut disminuïa. Succeeix el contrari amb els β -glucans, els quals són escassos en la superfície del gra, però que a mesura que aprofundim la concentració augmenta notablement.

Tot seguit, vam voler comprovar que concentrant farines de determinades fraccions podríem arribar a augmentar el contingut en un determinar compost bioactiu.

Veient que les fraccions del 5%, 10% i 15% del gra eren les que més arabinxilans i fenols presentaven vam optar per agrupar les seves farines i elaborar una galleta (**A**) que presentés activitat antioxidant. No obstant, però no vam utilitzar un 100% de farina

d’aquestes fraccions, sinó que vam optar per posar només un 30% i el 70% restant vam afegir farina de blat blanc, d’aquesta manera aconseguíem un equilibri entre la concentració d’arabinoxilans i fenols i l’esponjositat d’una galeta convencional de blat.

D’altra banda vam elaborar una segona galeta (**B**) rica en β -glucans, a partir d’un 30% de les fraccions del 20%, 25%, 30%, 40% i resta de gra d’ordi i un 70% de farina de blat.

<i>Galeta</i>	<i>% Blat</i>	<i>% Ordi</i>	<i>Fracció d’ordi</i>
<i>A</i>	70	30	Externa 0-15%
<i>B</i>	70	30	Interna 20-100%
<i>C</i>	0	100	0-100%
<i>T</i>	100	0	0

***Taula 3.1** Taula resum dels diferents tipus de galeta.*

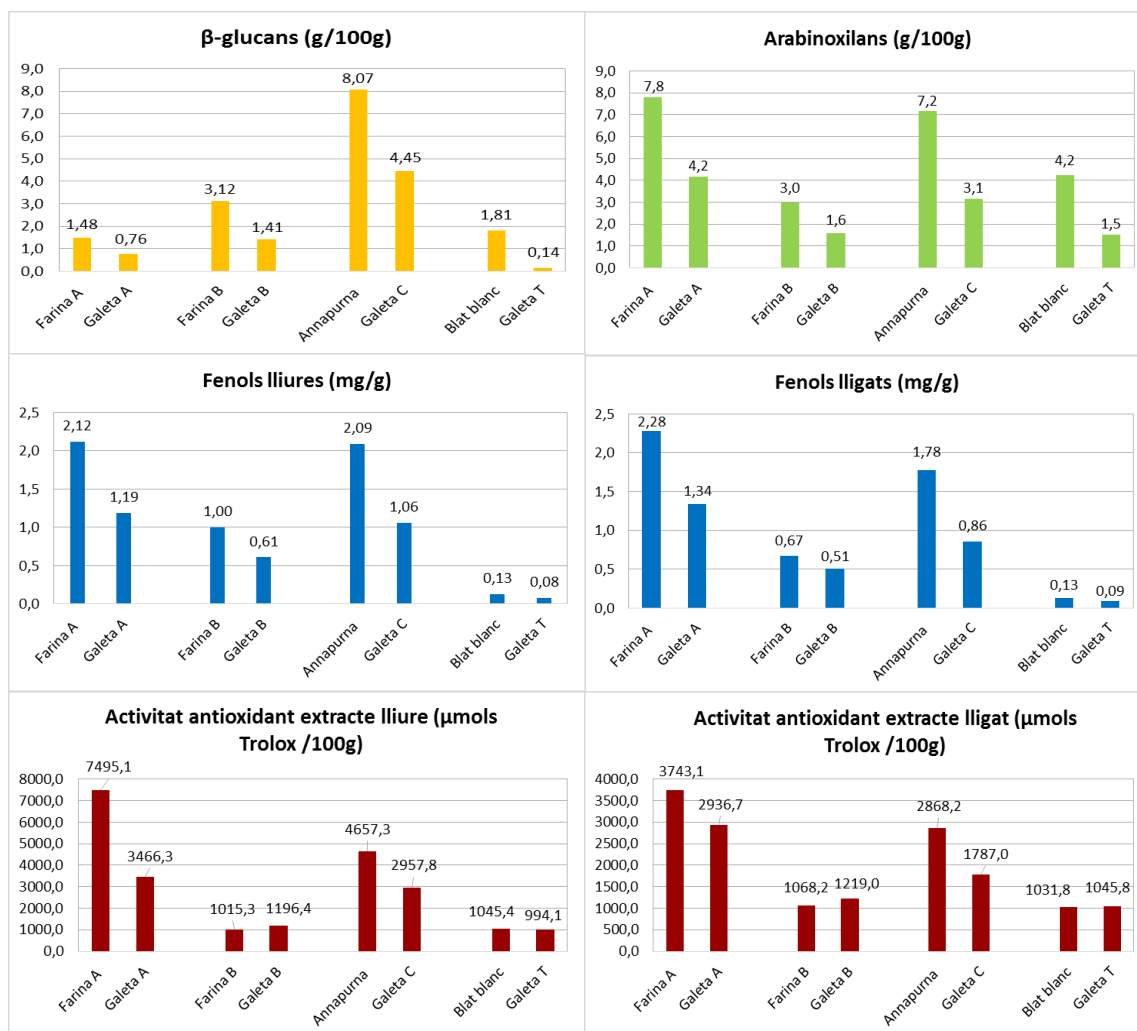
Un cop cuinades les quatre varietats de galeta vam observar que, tot i que el pes mitjà d’una galeta era de 20g aprox., aspectes com el color i el volum variaven d’una a l’altra.

Les galetes A i C elaborades a partir de les cobertes externes del gra i gra integral d’ordi, respectivament, presentaven colors marronosos més foscos, a diferència de les galetes B i T, elaborades a partir de fraccions internes del gra d’ordi i farina de blat, respectivament, és a dir, succeeix el mateix que amb les farines de les fraccions d’ordi.



***Figura 3.2** Galetes resultants: A, B, C i T, de esquerra a dreta .*

Pel que fa al volum de les galetes, tot i que no s’ha mesurat, s’ha pogut apreciar que quan s’introdueix farina d’ordi, la mescla disminueix de mida. Les més voluminoses són les galetes T, cuinades a partir d’un 100% farina de blat, ja que contenen gluten, i les que menys les galetes C, cuinades a partir de farina integral d’ordi.



Gràfic 3.2 Recull dels resultats de tots els anàlisis de les galetes.

Posteriorment, vam voler observar també com afectava els procés preparació al contingut en compostos bioactius de les galetes. Així doncs, vam tornar a repetir els mateixos anàlisis ara amb mostres de les quatre galetes elaborades: Galeta A (activitat antioxidant) Galeta B (β-glucans), Galeta C (farina *Annapurna* 100%) i Galeta T (farina de blat 100%).

Els resultats dels anàlisis (**Gràfic 3.2**) van indicar que el contingut en compostos bioactius disminuïa notablement en les galetes.

Aquesta disminució de compostos actius en el pas de farina a galeta es deu en gran part a la dilució que succeeix en elaborar la massa. La massa conté només un 48% de farina i la resta és d'altres ingredients, per tant és lògic tenir una reducció superior al 48%. Una disminució major es pot atribuir a l'efecte de la temperatura durant l'elaboració de les galetes, però aquest efecte és molt poc apreciable ja que el temps de cocció ha estat molt curt (10 minuts).

Tot i així, les galetes A i B elaborades a partir de fraccions de gra d’ordi, destaquen per ser les que més contingut presenten en comparació amb les altres dues varietats.

A més a més, la galeta B es consolida com un aliment funcional ja que amb una ració de 3 galetes s’aporta més del 0,75 g de β -glucans requerits per la EFSA per un aliment d’aquestes característiques. La galeta B per tant pot actuar reduint els nivells de colesterol en sang, els efectes cancerígens o millorant el sistema immunològic.

La galeta A, amb alt contingut en arabinosilans i fenols, és idònia per contrarestar els efectes oxidatius, els quals alguns estudis relacionen amb el procés d’envelliment, no només això, sinó que també pot actuar reduint els nivells de glucosa postprandial en individus sans i pacients diabètics gràcies al seu alt contingut en arabinosilans.

Cal afegir la idoneïtat d’aquestes galetes gràcies al seu escàs contingut en greix (que a més a més és vegetal). Altrament, es planteja la possibilitat d’afegir altres ingredients saludables que podrien donar-li més sabor a les galetes com per exemple, llimó, canella, cacau, etc.

A més a més, cal destacar la gran viabilitat de portar a terme aquest procediment a nivell industrial, ja que s’arriba a aprofitar la totalitat del gra d’ordi, sense descartar cap gram de farina, gràcies al procés del perlat, que ha estat la clau en aquest treball.

A tall de conclusió, podem afirmar que s’ha corroborat la principal hipòtesi d’aquest treball la qual era elaborar aliments amb propietats funcionals específiques utilitzant diferents parts del gra d’ordi de la varietat *Annapurna*.

Aquest Treball de Recerca, per tant, no és més que el meu granet de sorra en tota aquest moviment que busca perfeccionar els aliments que tenim a l’abast i que consumim i donar-los-hi un valor afegit que beneficiï la nostra salut. Haver tingut l’oportunitat de participar en una investigació pionera i innovadora, com aquesta, ha estat una experiència molt gratificant que recompensa totes les hores dedicades.

4. Bibliografia

Acker, L., and Becker, G.; (1971); “New research on the lipids of cereal starches: II. The lipids of various types of starch and their binding to amylose”; Ed. Starch/Stärke; Vol. 23 p.419–424.

Adom, K. K., and R. H. Liu.; (2002); “Antioxidant activity of grains”. J. Agric. Food Chem; Vol.50 p.6182–6187; [Consultat el Juny de 2018] WEB: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0205099>.

Ainsworth, A. E., and K. M. Gillespie.; (2007); “Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent”; DINS: Nature Protocols; Vol. 2 p.875–877; WEB: <https://www.nature.com/articles/nprot.2007.102>. [Consultat l’agost de 2018].

Ajithkumar, A., Andersson, R., Christerson, T., and Åman, P.; (2005); “Amylose and β -glucan content of new waxy barleys”; Ed. Starch/Stärke; Vol.57 p.235–239.

Åman, P., Hesselman, K., and Tilly, A.-C.; (1985); “Variation in the chemical composition of Swedish barleys”; DINS: J. Cereal Sci.; Vol. 3 p.73–77.

Åman, P., and Newman, C. W.; (1986); Chemical composition of some different types of barley grown in Montana, USA: DINS: J. Cereal Sci.; Vol. 4 p.133–141.

American Association of Cereal Chemists Report.; (2001); “The definition of dietary fiber” DINS: Dietary Fiber Definition Committee; Ed. Cereal Food World; Vol.3 p.112–126.

Baik, B. K.; (2008); “Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest.” Ed. Journal of Cereal Science; Vol. 48, p. 233–242. WEB:

https://www.researchgate.net/publication/222577594_Barley_for_food_Characteristics_improvement_and_renewed_interest. [Consultat l’agost de 2018].

Bengtsson, S., A°man, P., Graham, H., Newman, C. W., and Newman, R. K.; (1990); “Chemical studies on mixed-linked β -glucans in hulless barley cultivars giving different hypocholesterolemic responses in chickens”; Ed. J. Sci. Food Agric.; Vol. 52 p.435–445.

Bhatt, R. S., and Rossnagel, B. G.; (1997); “Zero amylose lines of hulless barley”; DINS: Cereal Chem.; Vol. 74 .190–191.

Bobo García, G; Davidov Pardo, G; Arroqui C; Vírveda ,P; Marín-Arroyo M.R.; Navarro, M.; (2014); “Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods”; DINS: Journal of the Science of Food and Agriculture.

Brandt, A. B.; (1976); “Endosperm protein formulation during kernel development of wild type and a high-lysine barley mutant”; DINS: Cereal Chem.; Vol. 53 p.890–901.

Cipriano, D. Viscovo, G. Clemente, R. Landberg, G. Pacini, A.A. Rivellese, G. Riccardi.; (2014); “A whole-grain cereal-based diet lowers postprandial plasma insulin and triglyceride levels in individuals with metabolic syndrome”; DINS: Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases, NMCD; Vol. 24 p.837–844.

Coronado, M., Salvador Vega H., León Rey Gutiérrez T., Marcela Vázquez F. Radilla V. Claudia.; (2015); "Antioxidantes: perspectiva actual para la salud humana". DINS: Revista chilena de nutrición. Vol. 42, N°2; ISSN: ISSN 0717-7518.

Eastwood MA.; (1992); “The physiological effect of dietary fiber”. DINS: Annual Review of Nutrition; Vol. 12: p. 19-35.

García, Tomás; (2010); “El Pequeño Larousse Ilustrado”; Mèxic: Larousse.; DINS: «Proteína»; 6ª Edició. p. 1824.; ISBN 978-607-4-00139-6.

Henry, R.; Trinder, P.; (2013); “Glucosa (GOD-PAP, Reactivo líquido para la determinación fotométrica de Glucosa en suero o plasma y otros fluidos biológicos”; DINS: Valtik diagnostics; p.1; WEB: <http://andinamedica.com.pe/wp-content/uploads/2016/08/VTK-glucosa.pdf> . [Consultat: l’agost de 2018].

Hoadley, E., and James. ; (2006); “Food Labeling: Health Claims; Soluble Dietary Fiber from Certain Foods and Coronary Heart Disease”; DINS: Federal register; Vol. 71, nº.98, p.29248-29250; WEB: <https://www.gpo.gov/fdsys/pkg/FR-2006-05-22/pdf/06-4703.pdf>. [Consultat el setembre de 2018].

Kit D-xylose, including xylan & arabinoxylan. Megazyme International Ireland (2014).

Lodish H., Berk A., Matsudaira P., Kaiser C., Krieger M., Scott M., Zipursky S., Darnell J. ; (2004); “Molecular cell biology”; Ed. RR Donelley & Sons Company; 5ª Edició, p.59-72 pp.

Londoño, Londoño Julian.; (2012); “Antioxidantes: importancia biológica y métodos para medir su actividad”; Ed. Corporación Universitaria Lasallista; Capítol 9; ISBN: 978-958-8406-14-5; WEB: <http://hdl.handle.net/10567/133>. [Consultat l’agost de 2018].

López Queroll, Antoni; Serra Gironella, Joan; i Sayeras Oliveras, Roser.; (2016); “Panorama varietal de la cebada para siembras de otoño”; Ed. INNOVAGRI; [Publicat l’1 d’agost de 2016]; WEB: <https://www.innovagri.es/investigacion-desarrollo-inovacion/panorama-varietal-de-la-cebada-para-siembras-de-otono.html> . [Consultat el juny de 2018].

Newman , R.K. ; Newman C. W; (2008) “Barley for Foodand Health. Science, technology, and products”.; United States of America.; Ed. Wiley;; Capítols 4 i 5; ISBN 978-0-470-10249-7.

Prior, R.L, Hoang, H., Gu, L., Bacchiocca, M., Howard, L., Hampsch-Woodill, M., Huang, D., Ou, B., Jacob, R; (2003); “Assays for Hydrophilic and Lipophilic Antioxidant Capacity (Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC)) of Plasma and Other Biological and Food Samples; DINS: Journal of Agricultural and Food Chemistry.; Vol. 51, p.3273-3279.

Prior, R.L., Wu, X., Schaich, K.; (2005); “Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Food and Dietary Supplements”; DINS: Journal of Agricultural and Food Chemistry; Vol. 53, p. 3101-3113.

Runge, F.F.; (1834); “Ueber einige Produkte der Steinkohlendestillation” (On some products of coal distillation), “Annalen der Physik und Chemie”, Runge names phenol “Karbolsäure” (coal-oil-acid, carboic acid) and Runge characterizes phenol; N°31, Vol. 31, p.65-78.; WEB: https://babel.hathitrust.org/cgi/pt?id=wu.8904_8351654;view=1up;seq=81 . [Consultat l’agost de 2018].

Sosa, Iván Arenas; Sánchez, José Luis, López.; (2004); “Espectrofotometría de absorción”; DINS: Cuernavaca; Instituto de Biotecnología; Universidad Nacional Autónoma de México, Maestría en ciencias bioquímicas; p.3; Enllaç: http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/espectrometria_de_absorcion.pdf. [Consultat el setembre de 2018]

Sullivan, P., Arendt, Elke. , and Gallagher, Eimear; (2013); “The increasing use of barley and barley by-products in the production of healthier baked goods”; DINS: *Trends*

in food Science & Technology; Ed. Elsevier; Vol.29; p.124-134; WEB: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.10.005>. [Consultat l’agost de 2018].

S. Zhou, X. Liu, Y. Guo, Q. Wang, D. Peng, L. Cao; (2010); “Comparison of the immunological activities of arabinoxylans from wheat bran with alkali and xylanase-aided extraction”; DINS: Carbohydr. Polym.; Vol. 81 p.784–789.

Yu, J., T. Vasanthan, and F. Temelli; (2001); “Analysis of phenolic acids in barley by high-performance-liquid-chromatography2. J. Agrie.; DINS: Food Chem.; Vol. 49 p.4352–4358; WEB: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf0013407> . [Consultat l’agost de 2018].

Zheng, G. H., Rossnagel, B. G., Tyler, R. T., and Bhatti, R. S.; (2000); “Distribution of β -glucan in the grain of hulless barley”; DINS: Cereal Chem.; Vol. 77, p.140–144.

Z.X. Lu, K.Z. Walker, J.G. Muir, T. Mascara, and K. O’Dea; (2000); “Arabinoxylan fiber, a byproduct of wheat flour processing, reduces the postprandial glucose response in normoglycemic subjects”; DINS: Am. J. Clin. Nutr.; Vol.71 p.1123–1128.

Annex I. Full de càlcul. Quantificació de β -glucans.

Farines

[Instructions](#)
[Contact Us](#)

Sample details

FRACCIONS ANNAPURNA

Absorbance values for 100 micrograms of D-glucose standard

Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Average
0,7060	0,7200	0,7190	0,7100	0,7138

Factor: 140,1051

Sample identifier	Absorbance values				Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Beta-Glucan (mg/L) "as is"	Sample weight (mg)	Extraction volume (mL)	Beta-Glucan (g/100 g) "as is"	Moisture Content %	Beta-Glucan (g/100 g) "dwb"
	Blank	Sample		ΔAbs								
1	5%	0,0270	0,1530	0,1480	0,10	1	155,7268	100,5	9,4	1,4565	6,02	1,5499
2	10%	0,0410	0,3800	0,3890	0,10	1	433,1349	101	9,4	4,0312	5,87	4,2825
3	15%	0,0409	0,4800	0,4930	0,10	1	561,8774	100,9	9,4	5,2345	5,6	5,5451
4	20%	0,0410	0,5120	0,5900	0,10	1	643,0823	101	9,4	5,9851	6,75	6,4184
5	25%	0,0450	0,6450	0,6430	0,10	1	755,3065	102	9,4	6,9607	7,14	7,4959
6	30%	0,0451	0,6990	0,6930	0,10	1	820,7496	101,6	9,4	7,5935	7,26	8,1880
7	40%	0,0450	0,7540	0,7560	0,10	1	895,2715	101,2	9,4	8,3158	7,53	8,9929
8 RESTA GRA		0,0450	0,8230	0,8340	0,10	1	987,9510	101,5	9,4	9,1495	6,8	9,8171
9 ANNAPURNA		0,0453	0,6760	0,6860	0,10	1	800,9527	100,5	9,4	7,4915	7,2	8,0727
10 BLAT BLANC		0,0432	0,1890	0,1860	0,10	1	181,9545	100,3	9,4	1,7053	5,8	1,8103
11 BLAT INTEGRAL		0,0451	0,1990	0,2100	0,10	1	200,9947	100,1	9,4	1,8875	6,03	2,0086
12 CONTROL		0,0289	0,3240	0,3230	0,10	1	371,4746	100,3	9,4	3,4814	10,9	3,9073

Galetes



Mega-Calc™
Barley and Oat Beta-Glucan Determination

Setting new standards in test technology

FEED ANALYSIS

FOOD ANALYSIS

BEVERAGE ANALYSIS



Sample details

Mostres galetes

[Instructions](#)
[Contact Us](#)

Absorbance values for 100 g of D-glucose standard

Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Average
1,0830	1,0570	1,0620	1,0570	1,0648

Factor:

93,9188

Sample identifier	Absorbance values			Sample volume (mL)	Dilution (-fold)	Beta-Glucan (mg/L) "as is"	Sample weight (mg)	Extract volume (mL)	Beta-Glucan (g/100 g) "as is"	Moisture Content %	Beta-Glucan (g/100 g) "dwb"
	Blank	Sample	Δ Abs								
1 ANAPURNA MESCLA A	0,0550	0,2430	0,2450	0,10	1	159,7558	202,7	9,4	0,7409	2,41	0,7591
2 ANAPURNA MESCLA B	0,0260	0,2620	0,2540	0,10	1	196,1024	201,7	9,4	0,9139	1,96	0,9322
3 ANAPURNA MESCLA C	0,0340	1,1830	1,1270	0,10	1	947,5464	204,3	9,4	4,3597	2,13	4,4546
4 ANAPURNA MESCLA T	0,0520	0,0880	0,0860	0,10	1	29,5844	201,6	9,4	0,1379	2,11	0,1409
5 MESCLA FARINA A	0,0270	0,1760	0,1760	0,10	1	125,9451	87,2	9,4	1,3577	8,55	1,4846
6 MESCLA FARINA B	0,0270	0,3610	0,3220	0,10	1	265,8371	86,3	9,4	2,8956	7,11	3,1172
7 FARINA CONTROL	0,0140	0,4240	0,4200	0,10	1	344,8697	82,2	9,4	3,9438	10,1	4,3868
8											